

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Henneberg

VERSUCHE ZUR QUALITÄTSÄNDERUNG VON DIPHtherie-TOXOID-
IMPFSTOFFEN, SPEZIELL ZUR VERBESSERUNG DER DEPOT-WIRKUNG,
UM DIE ANZAHL DER WIEDERHOLUNGSIMPFUNGEN EINZUSCHRÄNKEN.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Günter Stenschke
aus
Berlin
1962

4. Okt. 1963

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Henneberg

VERSUCHE ZUR QUALITÄTSÄNDERUNG VON DIPHtherie-TOXOID-
IMPFSTOFFEN, SPEZIELL ZUR VERBESSERUNG DER DEPOT-WIRKUNG,
UM DIE ANZAHL DER WIEDERHOLUNGSIMPFUNGEN EINZUSCHRÄNKEN.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Günter Stenschke
aus
Berlin
1962



Dekan : Prof. Dr. phil. Herbert Lüers

1. Referent: Prof. Dr. med. Georg Henneberg

2. Referent: Prof. Dr. phil. Gerhard Schenck

3. Referent: Prof. Dr. phil. Norbert Kreutzkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1962

Tag der Promotion :

27. FEB. 1963

Die vorliegende Arbeit wurde im Robert Koch-Institut Berlin in der Zeit von Juli 1960 bis Juli 1962 durchgeführt.

Das Thema dieser Arbeit erhielt ich von

Herrn Prof. Dr. med. Georg H e n n e b e r g,
1. Direktor des Robert Koch-Instituts Berlin,

dem ich für seine ständige Beratung und großzügige Förderung zu größtem Dank verpflichtet bin.

Herrn Dr. J. D r e s c h e r möchte ich meinen Dank für wertvolle Ratschläge zu meiner Arbeit aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung	5
B. Problemstellung	14
C. Experimenteller Teil	17
I. Diphtherie-Formol-Toxoid	17
a) Methode der β -Flockung nach RAMON	17
b) I _f -Wert-Bestimmung des vorliegenden Diphtherie-Formol-Toxoids	17
c) Stickstoffbestimmung des Diphtherie-Formol- Toxoids nach der Methode von Kjeldahl	19
d) Bestimmung des isoelektrischen Punktes	19
II. Adsorbens	20
a) γ -Aluminiumoxyd	20
b) Aluminiumhydroxyd	21
III. Adsorption	22
a) Allgemeines	22
b) Methodik der Adsorption	24
c) Untersuchungen über die Geschwindigkeit der Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes nach Durchmischen des Systems	25
d) Untersuchungen über die Abhängigkeit der Adsorption vom p _H -Wert	27
1.) Einstellung des p _H -Wertes über Sörensen-Puffergemische	27
2.) Einstellung des p _H -Wertes mit ⁿ /100 Salzsäure und ⁿ /100 Natronlauge ..	28
e) Untersuchungen über die Abhängigkeit der Adsorption von der Molarität	30
f) Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf die Adsorption	31
g) Aufnahme der Adsorptionsisotherme nach FREUNDLICH für das System Diphtherie- Toxoid- γ -Aluminiumoxyd	32

	Seite
IV. Impfstoffherstellung	41
a) Impfstoff I	41
b) Impfstoff II	42
c) Impfstoff III	43
V. Tierversuche	43
a) Injektion	44
b) Blutentnahme und Serumbereitung	44
VI. Serologische Untersuchung	46
VII. Statistische Auswertungen	63
a) DUNCAN-Test	63
b) Ermittlung des Fehlers der Mittelwertdiffe- renz der Tiergewichtsgruppen	67
D. Zusammenfassung und Diskussion	71
E. Literaturangaben	76

A. Einleitung

EMIL VON BEHRING (1) war der erste, der die bislang geübte Expositionsprophylaxe für nicht ausreichend ansah und neue Wege zur Bekämpfung der Diphtherie einzuschlagen versuchte.

VON BEHRING behandelte Kulturen von *Corynebacterium diphtheriae* mit Jodtrichlorid und immunisierte Tiere mit den vorbehandelten Kulturen. Bei der Prüfinfektion mit vollgiftigen Bakterienkulturen konnte er eine hochgradige Immunität der Tiere nachweisen. Im Serum dieser immunisierten Tiere konnte er Substanzen nachweisen, die das Diphtheriegift unschädlich machten. Im Jahre 1890 hat damit VON BEHRING das Diphtherie-Antitoxin entdeckt; zur gleichen Zeit fand auch KITASATO (2) das Diphtherie-Antitoxin.

Mit der Anwendung des gereinigten antitoxinhaltigen Serums konnte eine spezifische Therapie der Diphtherie durchgeführt werden. VON BEHRING war aber überzeugt, daß als einziges Mittel gegen die Verbreitung der Diphtherie nur eine aktive Immunisierung in Frage kam. Er dachte an eine Impfung nach Art der Vakzination der Pocken.

Es war bekannt, daß Menschen, die eine Diphtherie durchgemacht haben, nicht ein zweites Mal an Diphtherie erkranken. Es muß ein Immunitätszustand bei den Betreffenden eingetreten sein, der eine zweite Erkrankung nicht zuläßt.

Erst im Jahre 1911, als die Zahl der Diphtherieerkrankungen und die Zahl der schweren Formen der Diphtherie zunahmen, beschäftigte man sich wieder intensiver mit der Frage der aktiven Immunisierung gegen Diphtherie.

Im Jahre 1912 wurde ein Impfstoff zur aktiven Immunisierung gegen Diphtherie hergestellt. Mit diesem Impfstoff führte KLEINSCHMIDT (3) an der Kinderabteilung der Medizinischen Klinik in Marburg die ersten Impfungen durch.

Die Anwendung von Toxin-Antitoxin-Gemischen bei Menschen ist zuerst von TH.SMITH im Jahre 1909 und 1910 (4) auf Grund erfolgreicher Versuche an Meerschweinchen empfohlen worden.

Die praktische Brauchbarkeit dieses Immunisierungsverfahrens mit T.A.-Gemischen an Menschen ist zuerst, nach langjährigen Vorversuchen an Tieren, von EMIL VON BEHRING im Jahre 1913 erwiesen worden. Er erzielte durch 1-2 Injektionen des aus Toxin-Antitoxin-Gemisch bestehenden Impfstoffes (T.A.-Impfstoff) ohne störende Allgemeinreaktionen einen beachtlichen Antitoxintiter im Blut von Kindern (5).

In Amerika führte PARK (6) zur gleichen Zeit große Untersuchungen über dieses Gebiet durch. Auf Grund seiner Arbeiten nahm man nach dem ersten Weltkrieg auch in Deutschland die von BEHRING in Angriff genommene Frage der aktiven Schutzimpfung wieder auf.

Es ergaben sich drei Möglichkeiten für T.A.-Gemisch-Impfstoffe:

- 1.) T.A.-Gemisch, unterneutral mit einem Überschuß an freiem Toxin ("Giftspitze")
- 2.) T.A.-Gemisch, neutral
- 3.) T.A.-Gemisch, überneutralisiert mit einem Überschuß an Antitoxin

Die immunisierende Wirkung der T.A.-Gemische entstand durch das mit der Zeit aus der T.A.-Bindung freiwerdende Toxin. Die Dissoziationsfähigkeit der Gemische war für die Immunisierung entscheidend.

Der nächste Schritt der Diphtherie-Impfstoffentwicklung waren die Toxin-Antitoxin-Flocken (T.A.F.). Der Toxin-Antitoxin-Flockung liegt die Präzipitation zwischen Bakterien-eiweiß und einem entsprechenden Immunserum zugrunde. Sie wurde zuerst von GEORGI (7) und davon unabhängig von NICOLLE, CÉSARI und DEBAINS (8) im Jahre 1920 beobachtet.

Im Jahre 1922 entwickelte RAMON (9) aus der Erscheinung der Flockung ein nach ihm benanntes Verfahren, um Toxin und antitoxisches Serum gegeneinander auszuwerten.

Die Wirkungsweise der T.A.F.-Präparate unterschied sich von den flüssigen T.A.-Präparaten durch langsame Dissoziation des Toxins aus den T.A.-Flocken sowie durch Unlöslichkeit der Flocken des Präparates in der Gewebsflüssigkeit. Durch diese Eigenschaften entstand bei subkutaner Einspritzung ein sogenanntes D e p o t von T.A.-Flocken. Aus dem Depot dissoziierte das Toxin langsam und in unterschwelligen Dosen ab, wodurch der Organismus eine längere Zeit einer allerdings geringen Toxineinwirkung ausgesetzt war.

Die bisher beschriebenen Präparate leiteten die Entwicklung der aktiven Diphtherie-Schutzimpfung ein, haben aber heute keine praktische Bedeutung mehr. Das Ziel, das man sich setzte, war ein langandauernder Schutz, den man durch Verlängerung der Immunisierungszeit zu erreichen versuchte. Es gab für dieses Vorhaben nur den Weg über den Depot-Impfstoff. Die größte Schwierigkeit beim Aufbau eines Diphtherie-Depot-Impfstoffes lag in der Steigerung der Toxinmenge in der Impfstoffdosis, und zwar wegen der sehr hohen Toxizität des Diphtherie-Toxins. Der entscheidende Fortschritt in der Impfstoffherstellung war die Einführung des D i p h t h e r i e - T o x o i d s in die Praxis der Immunisierung.

GLENNY und SUDMERSEN (10) behandelten 1921 das Diphtherie-Toxin mit Formaldehyd. Es entstand das Toxoid oder Anatoxin, wie es RAMON bezeichnete.

EHRLICH bezeichnete bereits mit dem Ausdruck Toxoid ein durch Schwefelkohlenstoff entgiftetes Toxin. Formaldehyd wurde zuerst für die Entgiftung des Tetanus-Toxins im Jahre 1909 von LÖWENSTEIN (11) benutzt.

Die Diphtherie-Formol-Toxoide wurden von RAMON seit 1923 eingehend studiert und der Schutzimpfung des Menschen dienstbar gemacht.

Die Diphtherie-Toxoide werden heute so hergestellt, daß Diphtherie-Toxin aus Kulturen von PARK-WILLIAMS-Nr.8-Stämmen

in Nährbouillon besonderer Zusammensetzung nach 8 bis 10 Tagen gewonnen wird. Das toxische Bouillonfiltrat wird mit Formaldehyd-Lösung (40%ig), bis zu einer Konzentration von 0,4-0,5%, versetzt und bei 39°-40°C im Wasserbad, bei einem p_H -Wert von 8, vier Wochen lang gehalten. Das erhaltene Roh-toxoid wird durch verschiedenartige Prozesse gereinigt und konzentriert (12).

Die Toxin-Toxoid-Umwandlung ist irreversibel.

Das Wesen des Toxoids besteht darin, daß es ungiftig ist, und die ursprüngliche Antigenität des Toxins, d.h. die Antikörperbildung im Organismus zu veranlassen sowie Antitoxin zu binden, erhalten bleibt.

Nach den Ergebnissen der Reindarstellung von Diphtherie-Toxin bzw. -Toxoid durch THEORELL, BOIVIN, EATON und PAPPENHEIMER (13) ist die wirksame Substanz ein hitze-koagulables, säurefällbares, mit Ammoniumsulfat aussalzbares Protein mit etwa 16% Stickstoff und einem Molekulargewicht von ca. 70 000 (13).

Nachdem ein hochwertiges Toxoid als Antigen vorlag, war es für den Erfolg der aktiven Immunisierung von größter Bedeutung, daß das Toxoid mittels eines Adsorbens zur langsamen Elution im Organismus gelangte.

Die Bedeutung von Begleitstoffen erkannte zuerst RAMON (15). Er gab seinem Anatoxin (=Toxoid) Tapioca bei und erzielte im menschlichen und tierischen Organismus eine gesteigerte Antikörperbildung.

Im Jahre 1926 berichteten GLENNY und Mitarbeiter (14) über Versuche, in denen sie durch Fällung des flüssigen Diphtherie-Formol-Toxoids mit Kalialaun und nach Injektion der in Kochsalz-Lösung aufgeschwemmten Präzipitate wesentlich höhere Antitoxinwerte als mit flüssigem Toxoid erzielen konnten. S.SCHMIDT und HANSEN (16) verwandten Aluminiumhydroxyd in der C_2 -Modifikation für die Adsorption von Diphtherie-Toxoid. HOLT und BOUSFIELD (17) benutzten Aluminiumphosphat als Träger des Toxoids.

In Deutschland hat sich die Aluminiumbehandlung von Diphtherie-Formol-Toxoid durchgesetzt. Diese Methode war schon 1926 bekannt, aber lange sehr umstritten. Man fürchtete, daß der Aluminiumzusatz zum Impfstoff nach der Injektion Nebenwirkungen haben könnte, andererseits fehlte aber ein exaktes Verfahren zur Wirksamkeitsmessung dieser Präparate.

FRIGGE (18) hat eine Methode zur Wertbemessung der Diphtherie-Impfstoffe eingeführt. Es konnte die Überlegenheit der mit Aluminiumverbindungen aufgebauten Diphtherie-Impfstoffe gezeigt werden.

Nach Versuchen von SCHMIDT-BURBACH (19) begann im Jahre 1936 das Anhaltische Seruminstitut mit der fabrikmäßigen Herstellung von Diphtherie-Alaun-Impfstoffen. Nach kurzer Zeit folgten die Behringwerke mit der Herstellung von Diphtherie-Aluminiumhydroxyd-Impfstoffen.

Die befürchteten Nebenwirkungen bei der Verwendung von Aluminium-Impfstoffen konnten LEACH, JENSEN und POECH (20) sowie FARAGO (21) nicht feststellen.

Im Jahre 1952 wurden auf der Konferenz der Weltgesundheitsorganisation (22) fünf Impfstoffe empfohlen :

- 1.) F T (Formol-Toxoid, roh und gereinigt)
Er ist den Adsorbatimpfstoffen in seiner Wirkung unterlegen.
- 2.) T A F (Toxoid-Antitoxin-Flocken)
Die Antikörperbildung trat nach Meer-schweinchenversuchen sehr langsam ein.
Er wird wegen seiner geringfügigen Lokalreaktion allenfalls bei älteren Kindern empfohlen.
- 3.) A P T (Alaunpräzipitiertes Toxoid)
In Tierversuchen war dieser Impfstoff zehnmal stärker wirksam als Formol-Toxoid.

4.) P T A P (purified toxoid, aluminium-phosphate precipitated)

Im Meerschweinchenversuch zeigte dieser Impfstoff eine 2,5 bis 5 mal stärkere Wirksamkeit als der Alaun-Toxoid-Impfstoff.

5.) P T A H (purified toxoid, aluminium hydroxide adsorbed)

Wesentlich wirksamer als Formol-Toxoid oder Toxin-Antitoxin-Flocken.

In Deutschland wird dieser Impfstoff als AL F T - Adsorbat-Impfstoff in den Handel gebracht.

Die Fähigkeit eines Impfstoffes, den Organismus zur Antikörperbildung zu veranlassen, läßt sich nicht allein durch Feststellung des Antigengehaltes mittels Lf-Wert beurteilen.

- Der Lf(=Limes flocculationis)-Wert pro ml ist die Maßeinheit für die spezifische Diphtherie-Toxin- oder -Toxoid-Substanz. Eine Lf-Einheit ist diejenige Gift- bzw. Toxoidmenge, die mit 1 Antitoxineinheit (IE = internationale Einheit) eine Initialflockung bewirkt. -

PRIGGE (18) hat die S c h u t z e i n h e i t e n (SE) eingeführt. Im Tierversuch wird die Schutzkraft des zu prüfenden Impfstoffes an der Schutzkraft eines als Maßpräparat dienenden Standardantigens gemessen. Die Messungsergebnisse am Tier stimmen mit den an Menschen erzielten Impferfolgen überein.

Durch die schon erwähnten "Aktivatoren" konnte die Immunisierung gegenüber Präparaten ohne "Aktivatoren" gesteigert werden. PRIGGE (18) hat eine Beziehung zwischen Wirksamkeit des Impfstoffes und Konzentration des "Aktivators" durch folgende Formel ausgedrückt:

$$S E = c \sqrt{L f \cdot A}$$

SE = Schutzeinheiten

c = Aktivitätskonstante für bekannten "Aktivator"

Lf = Flockungswert

A = Aktivatorkonzentration

Die Unterschiede der Immunisierungserfolge der verschiedenen Impfstoffe bei gleicher spezifischer Toxoidsubstanzmenge beruhen vorwiegend auf der unterschiedlichen Qualität des "Aktivators".

Durch die unterschiedliche Qualität des Zusatzstoffes ist ein Depot-Impfstoff nicht mit einem Adjuvans-Impfstoff gleichzusetzen; siehe auch POTEL (23):

- 1.) Adjuvans-Impfstoff: Der Antigenreiz wird durch Zugabe eines unspezifischen Reizstoffes (Adjuvans), wie Tapioca, Öl, Lanolin, Cholesterin usw. erhöht.
- 2.) Depot-Impfstoff: Das Entscheidende bei dem Depot-Impfstoff ist die Adsorption des Antigens an das Adsorbens, z.B. Aluminiumverbindungen. Nach der Impfung kommt es im Gewebe zur Bildung eines Depots, aus dem sich das Antigen dem Organismus über längere Zeit mitteilt. Es wird ein "Antigendauerreiz" ausgelöst, der die Antikörperbildung für längere Zeit aufrechterhält.

HENNEBERG (24) versucht durch den Antigendauerreiz den Immunitätszustand, der nach einer Erkrankung vorliegt, durch eine Impfung zu erreichen; wobei bestimmte Vorzüge der Depot-Impfstoffe für ihre Anwendung sprechen. Die erste Injektion ist von großer Bedeutung für den Zustand, das Ausmaß und die Dauer der Immunisierung. Es kommt zur Ausbildung einer spezifischen Grund- oder Basisimmunität. Es sollen in dem retikulo-endothelialen System möglichst zahlreiche Zentren gebildet werden, in denen die Antikörperproduktion in Gang kommt und für spätere Zeit vorbereitet wird. Spätere Injektionen können diesen Zustand grundsätzlich nicht mehr verändern. Durch den "Antigendauerreiz" haben die Zellen,

die für die Ausbildung der Immunität zuständig sind, "gelernt" Antikörper zu bilden; man kann von einem "Training" dieser Zellen sprechen.

DRESCHER (25) immunisierte in einer Versuchsreihe täglich Meerschweinchen durch intraperitoneale Injektionen mit PR8-Influenzavirus als Antigen in einer großen Flüssigkeitsmenge. Das Ergebnis der Versuchsreihe war die Ausbildung extrem hoher Antikörpertiter. Die erreichten Titerhöhen waren wesentlich größer als in einer zweiten Versuchsreihe mit Meerschweinchen, bei der durch Setzen von Antigeneinzelreizen in Form von täglich durchgeführten subkutanen Injektionen immunisiert wurde. Das Flüssigkeitsvolumen war im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe kleiner, der Antigengehalt der gleiche. Die Versuchszeit dauerte jeweils 30 Tage.

DRESCHER bezeichnete den Reiztyp der ersten Versuchsreihe als Antigendauerreiz, weil über eine längere Zeit eine ununterbrochene Zuführung des Antigens stattfand. In der zweiten Versuchsreihe waren innerhalb der Versuchszeit Intervalle, in denen keine Antigenezufuhr vorlag. Diesen Reiztyp bezeichnete DRESCHER als Antigeneinzelreiz; hier lagen die Antikörpertiter wesentlich niedriger als beim Antigendauerreiz.

Die Herstellung der Depot-Impfstoffe wurde auf die Erkenntnisse der obenerwähnten Untersuchungen eingestellt. Als Adsorbens wurde das γ -Aluminiumoxyd gewählt.

Im Robert Koch-Institut hat DRESCHER (26) einen Vergleich zwischen zwei Impfstoffen im Meerschweinchenversuch anhand der Antikörperverläufe für das Virus A/Asia/57 durchgeführt. DRESCHER stellte einen γ -Aluminiumoxyd-Impfstoff nach bestimmten Gesichtspunkten her und erhielt nach einmaliger Injektion im Durchschnitt 30 000 Antikörpergehaltseinheiten. Zur gleichen Zeit wurde eine zweimalige Injektion mit einem im Handel befindlichen Aluminiumhydroxyd-Adsorbat-Impfstoff, der annähernd die gleiche Virusmenge enthielt, durchgeführt. Der Durchschnitt der Antikörperkonzentration lag bei 700 Einheiten.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann eine optimale Bereitschaft zur Antikörperbildung nur mit Impfstoffen erzielt werden, bei denen die Zusammensetzung genau bekannt ist und bei denen bestimmte Grundsätze berücksichtigt werden, die in der folgenden Problemstellung definiert werden.

B. Problemstellung

Der Impfplan für die Diphtherie-Schutzimpfung nach WIESENER (22) sieht eine sechsmalige subkutane oder intramuskuläre Injektion vor. Die ersten drei Impfungen sollen im ersten Lebensjahr (3.-5. Lebensmonat), jeweils im Monatsabstand, bei einer Impfstoffdosis von 0,5 bis 1 ml durchgeführt werden. Die nächsten Injektionen werden im 18. Lebensmonat und im 6. und 14. Lebensjahr, bei einer Impfstoffdosis von 0,2-0,3 ml, empfohlen. Bei den zu verwendenden Impfstoffen handelt es sich um Diphtherie-Toxoid-Aluminiumhydroxyd-Adsorbat-Impfstoffe.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit besteht in der Qualitätsänderung des Diphtherie-Toxoid-Impfstoffes, mit dem Ziel, die Depot-Wirkung zu verbessern, um die Anzahl der Wiederholungsimpfungen eventuell einschränken zu können.

Nach Untersuchungen von FARAGO (27) und HENNEBERG (28) kommt dem Verlauf der Antigenresorption aus Depotimpfstoffen maßgebliche Bedeutung für ihre Wirksamkeit zu. Da die Antigenresorption von dem Aufbau des Depotimpfstoffes abhängig ist, müssen die Gesetzmäßigkeiten der Antigenadsorption an Stoffe, die als Depotmaterial verwendet werden sollen, gefunden werden.

Die Antigenadsorption ist von der Oberfläche des Adsorbens abhängig. Bei dem nach FRICKE, NIEMANN und FEICHTNER (29) hergestellten und für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten γ -Aluminiumoxyd läßt sich sowohl die Oberfläche als auch der Wassergehalt in einfacher Weise bestimmen.

Diese Voraussetzungen für die Verwendung des Adsorbens Aluminiumhydroxyd, das in den Diphtherie-Adsorbat-Impfstoffen des Handels vorliegt, lassen sich nicht mit der erforderlichen Genauigkeit erfassen.

Vor der Herstellung des Diphtherie-Depot-Impfstoffes werden Untersuchungen über das Adsorptionssystem - Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd - durchgeführt.

Zur Erfassung der Eigenschaften des in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden Adsorptionssystems ist es erforderlich, die Beziehungen zwischen den Bestimmungsgrößen des Systems (Schüttelzeit, Temperatur, p_H -Wert, Molarität) zu erfassen. Die Bestimmungsgrößen sind Faktoren, von denen das System abhängig ist. Auf diesem Wege soll dann die Gültigkeit der FREUNDLICH'SCHEN Adsorptionsisotherme (30) nachgewiesen werden.

Bei dem herzustellenden Diphtherie-Toxoid- -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoff sollen die dargelegten Grundsätze berücksichtigt werden, so daß ein definierter Depot-Impfstoff vorliegt.

Im Tierversuch soll sich ein Impfstoffvergleich zwischen den drei herzustellenden Impfstoffen anschließen:

- 1.) Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoff
- 2.) Diphtherie-Toxoid-Aluminiumhydroxyd-Depot-Impfstoff,
der ähnlich den im Handel befindlichen Diphtherie-Toxoid-Adsorbat-Impfstoffen aufgebaut ist.
- 3.) Diphtherie-Toxoid-Impfstoff,
ohne Adsorbenszusatz.

In diesen drei Impfstoffen muß jeweils die g l e i c h e Menge spezifischer Diphtherie-Toxoid-Substanz (Lf/ml) enthalten sein.

Als Versuchstiere sollen Meerschweinchen verwendet werden.

Für die Qualität der Impfstoffe wird als Maßstab die Größe der im Blut nachweisbaren spezifischen Antikörperbildung angesehen.

Nach der subkutanen Injektion der Impfstoffe soll die Höhe des Antitoxintiters im Serum der Meerschweinchen durch die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherie-Antitoxin nach CLAUS JENSEN (31) bestimmt werden. Für diese

Bestimmungen wird den Meerschweinchen in verschiedenen Zeitabständen nach der subkutanen Injektion Blut entnommen, so daß es sich hier um Diphtherie-Antitoxintiter-Bestimmungen in Abhängigkeit zur Dauer der Depotwirkung der Impfstoffe im tierischen Organismus handelt.

Die durch die drei verschiedenen Diphtherie-Impfstoffe erzielten Diphtherie-Antikörpertiterverläufe sollen verglichen werden.

C. Experimenteller Teil

I. Diphtherie-Formol-Toxoid

a) Methode der β -Flockung nach RAMON (9)

Der Toxin-Antitoxin-Flockung liegt die Präzipitation, d.h. Ausflockung aus gelöster Substanz, zwischen Bakterien-Eiweiß und einem entsprechenden Immunserum zugrunde.

Im Jahre 1922 entwickelte RAMON (9) aus der Toxin-Antitoxin-Flockung das nach ihm benannte Verfahren, um Toxin und antitoxisches Serum gegeneinander auszuwerten.

Bei der Methode der β -Flockung werden fallende Serumkonzentrationen mit konstanten Antigenmengen in gleichbleibenden Volumina gemischt. Bei einer Temperatur von 50°C im Wasserbad kommt es zu einer beschleunigten Präzipitation. Sowohl Antikörperüberschuß wie auch Antigenüberschuß bewirken eine Hemmung oder das völlige Ausbleiben der Flockung. Innerhalb der sogenannten "Äquivalenz-Zone", in der die Ausfällung des Toxin-Antitoxin-Komplexes quantitativ verläuft, reagiert e i n Röhrchen deutlich als e r s t e s und zeigt mit dieser sogenannten "Initialflockung" die Neutralisierung des Toxin-Antitoxin-Gemisches an (32). Die überstehende Flüssigkeit enthält weder Toxin noch Antitoxin. - Als Maßeinheit für die spezifische Diphtherie-Toxin- oder -Toxoid-Substanz ist die Lf-Dosis (Lf-Limes flocculationis) pro ml festgelegt. 1 Lf ist diejenige Gift- bzw. Toxoidmenge, die mit 1 Antitoxineinheit (IE-internationale Einheit) eine Initialflockung bewirkt. -

b) Lf-Wert-Bestimmung des vorliegenden Diphtherie-Formol-Toxoids

Für die vorliegende Arbeit stand zur Verfügung:

Diphtherie-Formol-Toxoid, gereinigt
Behringwerke, Op.-Nr. 1260 *)

*) Für die Bereitstellung des Diphtherie-Formol-Toxoids sei der Firma Behringwerke AG, Marburg-Lahn, besonders gedankt.

Mit Hilfe der β -Flockung nach RAMON wurde die spezifische Diphtherie-Toxoid-Substanz (Lf/ml) festgestellt. Als entsprechendes Diphtherie-Immunserum wurde Diphtherie-Flockungsstandard (1900 IE/ml), Behringwerke, Op.-Nr.22 260 verwandt. Das Serum wurde mit Kochsalzlösung (0,85%) so verdünnt, daß 1 ml dieser Verdünnung nur noch 100IE enthielt. Die Verdünnungsflüssigkeit bei allen weiteren Versuchen war 0,85%ige Kochsalzlösung.

Die Lf-Wert-Bestimmung wurde in einer Flockungsreihe (Tabelle 1) mit 7 Uhlenhuth-Röhrchen bei 50°C im Wasserbad so angesetzt, daß die zu erwartende Initialflockung in der Mitte der Versuchsreihe lag. Hierbei wurde in 7 Röhrchen je 1 ml Diphtherie-Toxoid pipettiert, dann die jeweils abgestufte Verdünnungsflüssigkeit und zuletzt das abgestufte, verdünnte Diphtherie-Flockungsstandard (1 ml = 100 IE) zugesetzt. Das Gesamtvolumen betrug in jedem Röhrchen 2 ml. Die Flockung setzte nach einer bestimmten Zeit ein.

Tabelle 1 stellt ein repräsentatives Beispiel für eine grössere Anzahl durchgeführter Flockungsreihen dar.

T a b e l l e 1

Flockungsprotokoll

IE ml Di-Toxoid	82	74	67	60	54	49	44
	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10 Min.				+			
11 "				++			
12 "			+	+++	+		
13 "			++	+++	++		
14 "			+++	+++	+++		
15 "			+++	+++	+++		
17 "		+	+++	+++	+++	+	
18 "	+	++	+++	+++	+++	++	+

Abstufung : 10%ig
 Gesamtvolumen : 2,0 ml
 Temperatur : 50°C Wasserbad

T a b e l l e 2

Flockungsprotokoll

IE ml Di-Toxoid	41 0,5	37 0,5	33 0,5	30 0,5	27 0,5	24 0,5	22 0,5
26 Min.				+			
28 "			+	++	+		
29 "			++	+++	++		
31 "			+++	+++	+++		
33 "		+	+++	+++	+++	+	
36 "		++	+++	+++	+++	++	
37 "		+++	+++	+++	+++	+++	
40 "	+	+++	+++	+++	+++	+++	+

Abstufung : 10%ig
 Gesamtvolumen : 2,0 ml
 Temperatur : 50°C Wasserbad

Der Lf-Wert des Diphtherie-Formol-Toxoids wurde sowohl bei einer Vorlage von 1,0 ml (Tabelle 1) als auch von 0,5 ml (Tabelle 2) Diphtherie-Formol-Toxoid bestimmt.

Die durchgeführten Blindversuche verliefen negativ.

Ergebnis: Der Lf-Wert des einzustellenden Diphtherie-Formol-Toxoids wurde mit 60 lf/ml festgestellt.

c) Stickstoffbestimmung des Diphtherie-Formol-Toxoids nach der Methode von Kjeldahl

Die Stickstoffbestimmung der Diphtherie-Formol-Toxoid-Lösung ergab für 1 Lf-Einheit 1,14% N.

d) Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Der p_H -Wert der Diphtherie-Toxoid-Lösung liegt bei 6,4 , gemessen mit dem Potentiometer der Firma Metrohm, Herisau/Schweiz. - Ein weiteres Charakteristikum der Toxoid-Lösung ist der isoelektrische Punkt, der durch tropfenweise Zugabe von n/100 Salzsäure und gleichzeitiger elektrischer p_H -Messung festgestellt wurde.

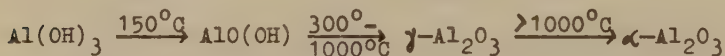
Ergebnis: Der isoelektrische Punkt liegt bei $p_H=4,9$.

II. Adsorbens

a) γ -Aluminiumoxyd

Für die vorliegende Arbeit wird γ -Aluminiumoxyd als Adsorbens verwendet.

Aluminiumoxyd kommt in der Natur als Korund und Schmirgel vor. γ -Aluminiumoxyd ist eine kubische Modifikation des Aluminiumoxyds, die beim Entwässern durch Glühen von Hydrargillit $\text{Al}(\text{OH})_3$, Böhmit $\text{AlO}(\text{OH})$, Bauxit oder amorphen Aluminium-Oxydhydraten innerhalb eines bestimmten Temperaturintervalles (etwa $300\text{--}1000^\circ\text{C}$) entsteht. Beim Glühen über 1000°C geht es in hexagonales α -Aluminiumoxyd über, dieses ist säureunlöslich und nicht hygroskopisch. Das γ -Aluminiumoxyd ist ein weißes, in Wasser unlösliches, in starken Säuren dagegen lösliches, hygroskopisches Pulver.



Das verwendete γ -Aluminiumoxyd-Präparat wurde nach der Vorschrift von FRICKE, NIEMANN und FEICHTNER (29) hergestellt. Ein gesetzmäßiger Zusammenhang, wie diese Autoren zeigten, besteht zwischen der Größe der pro Mol vorhandenen Oberfläche und den Entwässerungsbedingungen. Je höher die Entwässerungstemperatur und je länger die Erhitzungszeit ist, desto kleiner ist die molare Oberfläche.

FRICKE, NIEMANN und FEICHTNER (29) geben für ein bei 600°C geglühtes Oxyd folgende Daten an:

T a b e l l e 3

Eigenschaften des verwendeten γ -Aluminiumoxyd-Präparates

Bezeichnung	Entwäss.- Zeit	Entwäss.- Temperatur	Oberfläche	Wasser- gehalt
$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	2 Std.	600°C	62300 m^2 pro Mol	1,5g%

γ -Aluminiumoxyd-Präparate haben stets einen bestimmten Wassergehalt, der durch Erhitzen einer abgewogenen Menge γ -Aluminiumoxyd auf 1100°C ermittelt wird. Die γ -Modifikation geht in die wasserfreie α -Modifikation über. Der auftretende Gewichtsverlust, der bei dem verwendeten Präparat bei 1,5g% lag, war gleich dem Wassergehalt des Präparates. Bei der Einwaage des γ -Aluminiumoxyds wurde der Wassergehalt nicht berücksichtigt. Das γ -Aluminiumoxyd-Präparat wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxyd aufbewahrt.

b) Aluminiumhydroxyd

Für die Herstellung des Diphtherie-Formol-Toxoid-Adsorbat-Impfstoffs wurde eine Aluminiumhydroxyd-Suspension der "Nitrit-Fabrik AG, Feldkirchen bei München", verwandt. Die Suspension enthielt 2,983g Aluminiumhydroxyd in 100 ml, das entsprach einem Aluminiumoxyd-Gehalt von 1,95g in 100 ml Suspension. Chemisch gebundenes Wasser blieb unberücksichtigt.

III. Adsorption

a) Allgemeines

Die unsymmetrischen Kraftverhältnisse an Grenzflächen bewirken, daß sich hier vielfach Stoffe, die in einer der beiden Nachbarphasen gelöst enthalten sind, bevorzugt ansammeln, während andere wiederum die Grenzzone meiden oder aus ihr verdrängt werden. Man nennt diese Erscheinung *A d s o r p t i o n*, und zwar positive oder negative, je nachdem eine Anreicherung oder Verarmung an dem betrachteten Stoff erfolgt (33).

Auch die Oberflächen fester Stoffe haben große adsorbierende Kräfte. Die im Innern eines festen Stoffes befindlichen Atome oder Moleküle üben nach allen drei Richtungen des Raumes ihre gegenseitigen Anziehungskräfte aus. Die Beanspruchung der Bindungskräfte der an der Oberfläche befindlichen Teilchen verläuft nur nach dem Innern, während sie nach außen frei wirksam bleiben; d.h. die Moleküle oder Atome der obersten Kristallgitterebene sind valenzmäßig nicht abgesättigt und können fremde Moleküle oder Atome mit großer Kraft binden. So kommt es, daß bei der Erscheinung der Adsorption die festen Stoffe befähigt sind, Gase oder gelöste Stoffe an ihrer Oberfläche anzureichern.

Je höher bei gegebener Temperatur die Konzentration des zu adsorbierenden gelösten Stoffes in der an das feste Adsorbens angrenzenden Lösungsphase ist, desto größer ist auch die an der festen Oberfläche adsorbierte Stoffmenge, da es sich um einen Gleichgewichtszustand handelt. Es zeigt sich, daß die je Flächeneinheit adsorbierte Stoffmenge einen bestimmten Sättigungswert, den der einmolekularen Oberflächenbesetzung, erreicht. FREUNDLICH (30) hat diese Beziehung in seiner Adsorptionsisotherme wiedergegeben. Sie ist die quantitative Beziehung zwischen der Konzentration des Stoffes in der Lösung und der adsorbierten Stoffmenge.

Freundlich'sche Adsorptionsisotherme:

$$\frac{x}{m} = \alpha \cdot c'^{\frac{1}{n}} \quad (1^*)$$

x = adsorbierte Stoffmenge

m = Masse

α = Konstante

n = Konstante

c' = Konzentration des zu adsorbierenden Stoffes in der Wasserphase nach Erreichung des Adsorptionsgleichgewichtes

Über die Adsorption von Antigenen sind verschiedene Arbeiten veröffentlicht worden; z.B. von CHANG, ISAAC und BAIN (34) (Adsorption von Bakteriophagen an Aluminiumhydroxyd), CAMBOSU (35) (Adsorption von Tetanustoxoid an Aluminiumhydroxyd), HARE und CURL (36) (Adsorption von Influenzavirus an Aluminiumhydroxyd), WAHL und LEWI (37) (Adsorption von Bakteriophagen des Bacillus subtilis an Aluminiumhydroxyd) und WUNDERLI (38) (Adsorption von M.K.S.-Virus an Aluminiumhydroxyd).

Auch die handelsüblichen Diphtherie-Formol-Toxoid-Adsorbat-Impfstoffe haben als Adsorbens das Aluminiumhydroxyd.

Aus schon vorher näher ausgeführten Gründen hat nun DRESCHER als Adsorbens γ -Aluminiumoxyd ausgewählt.

DRESCHER hat die Konstanten der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme für folgende Systeme aufgestellt:

Adsorptionssystem PR8-Influenzavirus - γ -Aluminiumoxyd (39)

Adsorptionssystem T₃-Bakteriophagen - γ -Aluminiumoxyd (40)

Adsorptionssystem A/2/Sing/1/57-Influenzavirus - γ -Aluminiumoxyd (41)

Adsorptionssystem B/Berlin/2/55 Influenzavirus - γ -Aluminiumoxyd (42)

SENSCH (43) hat die Konstanten der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme für das Adsorptionssystem Desoxyribonucleinsäure - γ -Aluminiumoxyd aufgestellt.

SCHREIER (44) konnte die Konstanten der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen Hämagglutinin und dem hämagglutinationshemmenden Antikörpern für verschiedene Influenzastämme ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Gesetzmäßigkeiten der Adsorption von Diphtherie-Toxoid an γ -Aluminiumoxyd untersucht werden, um diese Ergebnisse beim Aufbau des Diphtherie-Toxoid-Depot-Impfstoffes, der ein Adsorptionssystem darstellt, zu berücksichtigen.

Für die Aufnahme der Adsorptionsisotherme müssen verschiedene Voraussetzungen geprüft werden. Hierbei handelt es sich um Untersuchungen über die Abhängigkeit der Adsorption von der Geschwindigkeit der Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes, vom p_H -Wert, von der Molarität und von der Temperatur. Auf Grund dieser Ergebnisse werden weitere Untersuchungen über die Ermittlung und die Gültigkeit der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme für Adsorptionssystem Diphtherie-Toxoid an γ -Aluminiumoxyd angestellt.

b) Methodik der Adsorption

Ein bestimmtes Volumen der eingestellten Diphtherie-Toxoid-Lösung (60 Lf/1 ml) wird einer analytisch genau abgewogenen Menge γ -Aluminiumoxyd zugesetzt und maschinell durchgeschüttelt (220 Schwingungen/Min.). Die Suspension wird dann 15 Minuten zentrifugiert (3000 Umdrehungen/Min.), wobei das fein verteilte γ -Aluminiumoxyd sedimentiert. Die überstehende klare Lösung wird dekantiert und der Lf-Wert des nicht adsorbierten Diphtherie-Toxoids nach der Methode der β -Flockung von RAMON bestimmt. Die Differenz zwischen der vorgelegten, bekannten Menge Diphtherie-Toxoid-Substanz (60Lf/ml) und dem bestimmten Lf-Wert des Überstandes ergibt die adsorbierte Menge Diphtherie-Toxoid.

Unter gleichen Bedingungen durchgeführte Blindversuche zeigten, daß das Diphtherie-Toxoid nicht sedimentiert.

c) Untersuchungen über die Geschwindigkeit der Einstellung
des Adsorptionsgleichgewichtes nach Durchmischen des
Systems

Die einzelnen Versuchsansätze werden zeitlich abgestuft (5-60 Minuten), maschinell geschüttelt (220 Schwingungen/Minute) und in der schon beschriebenen Weise weiterbehandelt. Es liegt in jedem Versuchsansatz die gleiche Menge γ -Aluminiumoxyd, das gleiche Volumen und die gleiche Menge Diphtherie-Toxoid vor.

Lf-Konzentration	300 Lf/5ml
γ -Aluminiumoxyd	3 mg/5 ml
p _H -Wert	6,7
Temperatur	20 - 22°C
Zentrifuge	15 Min. (3000 U/Min.)
Volumen	5 ml

T a b e l l e 4

Einfluß der Durchmischungszeit auf die Adsorption

Schüttelzeit Min.	c Lf	c' Lf	x Lf
5	300	230	70
10	300	200	100
15	300	200	100
20	300	200	100
40	300	200	100
60	300	200	100

c = Lf-Gehalt der Wasserphase vor der Adsorption

c' = Lf-Gehalt der Wasserphase nach Einstellung des
Adsorptionsgleichgewichtes

x = Adsorbierte Toxoidmenge (Lf)

Diese Bezeichnungen werden in allen weiteren Versuchen
beibehalten.

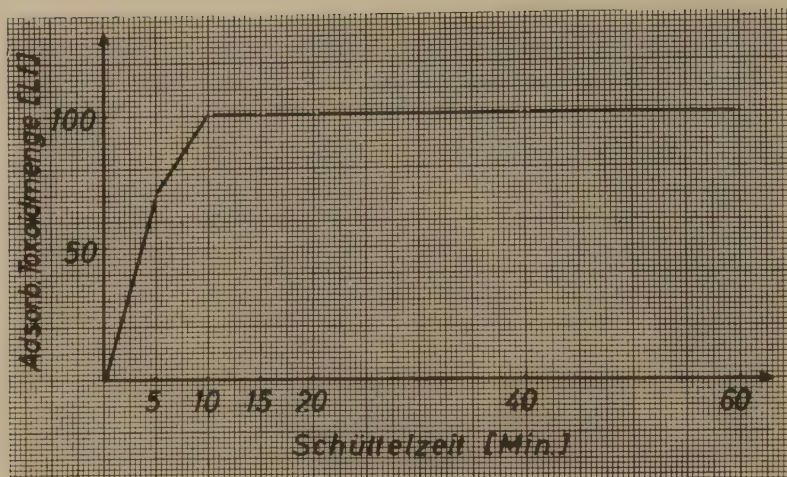


Abb. 1: Einfluß der Schüttelzeit auf die Adsorption

Aus Abb.1 ist ersichtlich, daß nach einer Schüttelzeit von 10 Minuten die adsorbierte Diphtherie-Toxoid-Menge konstant bleibt. Werden die gleichen Versuchsansätze nach einer Schüttelzeit von 10 Minuten 3 Tage bzw. 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt, dann zentrifugiert und der Überstand bestimmt, so ergibt sich keine Nachadsorption des Diphtherie-Toxoids.

T a b e l l e 5

Nachadsorption

Aufbewahrung bei 4°C	c Lf	c' Lf	x Lf
3 Tage	300	200	100
4 Wochen	300	200	100

Ergebnis: Es zeigt sich aus diesen Untersuchungen, daß sich das Adsorptionsgleichgewicht schon nach 10 Minuten maschineller Durchmischung eingestellt hat und die adsorbierte Diphtherie-Toxoidmenge auch bei längerem Schütteln konstant bleibt.
Eine Nachadsorption findet nicht statt.

d) Untersuchungen über die Abhängigkeit der Adsorption vom p_H -Wert

HANS SCHMIDT (46) sowie MASCHMANN, KÜSTER und FISCHER (47) haben die Adsorption von Diphtherie-Toxoid an C_γ -Aluminiumhydroxyd in Abhängigkeit zum p_H -Wert untersucht. Es hat sich ergeben, daß das Optimum der Adsorption bei einem p_H -Wert von 6 liegt. Es wurde auch gefunden, daß Natriumphosphat, das bei der Einstellung des p_H -Wertes über Puffergemische wichtig ist, die Adsorption hemmt.

Diese Fragen sollen auch für das Adsorptionssystem Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd geklärt werden.

Die p_H -Messungen werden mit dem elektrischen p_H -Meter durchgeführt.

1.) Einstellung des p_H -Wertes über Sörensen-Puffergemische (51)

Die Versuchsansätze wurden so durchgeführt, indem 5 ml Diphtherie-Toxoid 1 ml Sörensen-Puffergemisch, das aus abgestuften Mengen einer 1/5molaren Lösung von primärem Kaliumphosphat (Lösung 1) und einer 1/5molaren Lösung von sekundärem Natriumphosphat (Lösung 2) besteht, zugesetzt wird. Zu diesem Gesamtvolumen von 6 ml (=300 Lf) werden jeweils 3 mg γ -Aluminiumoxyd zugesetzt, dann jeder Ansatz einer elektrischen p_H -Messung unterzogen. Die weitere Behandlung sowie die Bestimmung des Überstandes werden nach der schon beschriebenen Methode durchgeführt.

Unter den gleichen Bedingungen werden jeweils Blindversuche, also Versuchsansätze ohne Adsorbens, durchgeführt.

Bei der Durchführung des Blindversuches bei einem p_H -Wert von 4,98 kam es bei der Lf-Bestimmung der Lösung zu keiner Präzipitation. Während des Verlaufs dieses Versuches konnte eine etwas stärkere Trübung festgestellt werden. Es wird hierbei wahrscheinlich zur Erreichung des isoelektrischen Punktes und somit zur Ausfällung des Proteins gekommen sein. Der Blindversuch bei $p_H=4,98$ hat ergeben, daß der Titer der Lösung nicht erhalten bleibt. In diesem p_H -Bereich können keine

Adsorptionsversuche unternommen werden. Die Blindversuche der anderen p_H -Einstellungen zeigten keine Titeränderungen.

Lf-Konzentration	300 Lf
γ -Aluminiumoxyd	3 mg
Temperatur	20-22°C
Schüttelzeit	15 Min.
Zentrifuge	15 Min. (3000 U./Min.)
Volumen	6 ml

Tabelle 6 stellt ein repräsentatives Beispiel für eine größere Anzahl durchgeführter Versuche dar.

T a b e l l e 6

p_H -Abhängigkeit der Adsorption

$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ mg	c Lf	c' Lf	p_H	Lsg.1 ml	Lsg.2 ml	x Lf
3	300	240	6	0,879	0,121	60
3	300	288	7	0,388	0,612	12
3	300	288	7,8	0,031	0,969	12

Lösung 1: $1/5$ m KH_2PO_4

Lösung 2: $1/5$ m Na_2HPO_4

Ergebnis: Es zeigt sich also, daß bei der Einstellung des p_H -Wertes bei dem Adsorptionssystem Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd über Phosphat-Puffergemische eine leichte Zunahme der Adsorption von $p_H=7,8$ über $p_H=7$ zu $p_H=6$ festzustellen ist.

2.) Einstellung des p_H -Wertes mit $n/100$ Salzsäure und $n/100$ Natronlauge

Da bei der Einstellung des p_H -Wertes der Lösung über Sörensen-Puffergemische die Adsorption zu gering ist, werden 5 ml Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Suspension direkt unter der Glaselektrode des p_H -Meters durch tropfenweise Zugabe von $n/100$ HCl oder $n/100$ NaOH auf einen bestimmten p_H -Wert

eingestellt. Die Adsorption sowie die Bestimmung des nicht adsorbierten Toxoids werden nach der üblichen Methode durchgeführt. Bei der Durchführung des Blindversuchs im p_H -Bereich von 4,95 kam es bei der Lf-Bestimmung der Lösung zu keiner Präzipitation. Es konnten in diesem p_H -Bereich keine Adsorptionsversuche durchgeführt werden. Die Blindversuche der anderen zu untersuchenden p_H -Bereiche zeigten keine Titeränderungen.

Lf-Konzentration 300 Lf/5ml
 γ -Aluminiumoxyd 3 mg/5 ml
 Temperatur 20 - 22°C
 Schüttelzeit 15 Min.
 Zentrifuge 15 Min. (3000 U./Min.)
 Volumen 5 ml

Tabelle 7 stellt ein repräsentatives Beispiel für eine größere Anzahl durchgeführter Versuche dar.

T a b e l l e 7

p_H -Abhängigkeit der Adsorption

p_H	c Lf	c' Lf	x Lf
6	300	190	110
7	300	200	100
8	300	200	100

Schwankungen des p_H -Wertes $\pm 0,1$

Ergebnis: Es ergibt sich, daß es zu einer Zunahme der Adsorption bei der direkten Einstellung des p_H -Wertes mit $n/100$ Salzsäure oder $n/100$ Natronlauge in dem Adsorptionssystem Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd kommt.

Gesamtergebnis über die Abhängigkeit der Adsorption

vom p_H -Wert: Im Vergleich zur Einstellung des p_H -Wertes mit Sörensen-Puffergemischen ist die Adsorption

von Diphtherie-Toxoid an γ -Aluminiumoxyd bei der direkten Einstellung des p_H -Wertes mit $n/100$ Salzsäure oder $n/100$ Natronlauge wesentlich größer (Abb.2).

Die höchste Adsorption wird bei einem p_H -Wert von 6,0 gefunden.

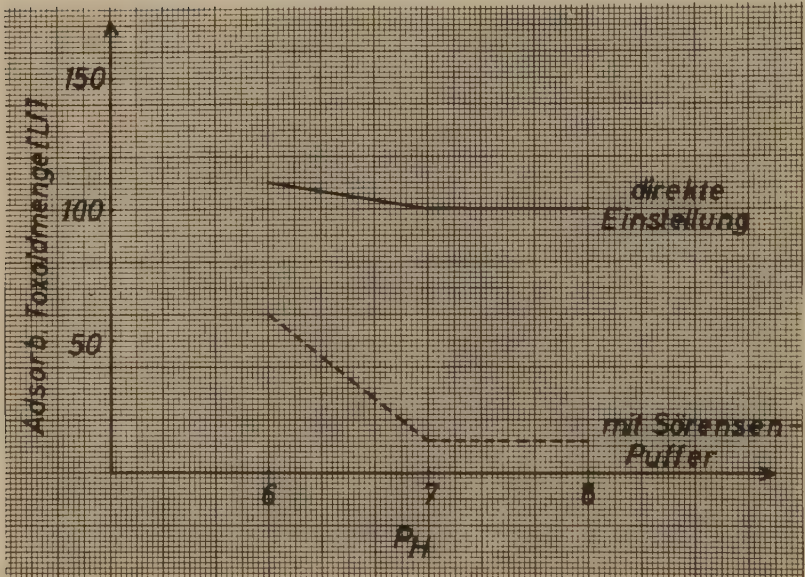


Abb.2: Einfluß des p_H -Wertes auf die Adsorption

e) Untersuchungen über die Abhängigkeit der Adsorption von der Molarität

Bei den Versuchsansätzen wird die Molarität eingestellt durch Zusatz von abgestuften Mengen Natriumchlorid zur Diphtherie-Toxoid-Lösung, dann wird γ -Aluminiumoxyd analytisch eingewogen und zugesetzt. Die Adsorption sowie die Bestimmung des nicht adsorbierten Diphtherie-Toxoids wird nach den schon beschriebenen Methoden durchgeführt. Die Durchführung von

Blindversuchen, also Ansätze ohne Adsorbens, zeigte keine Titeränderung der Lösung.

Lf-Konzentration	300 lf/5 ml
γ -Aluminiumoxyd	3 mg/5 ml
p _H -Wert	6,7
Temperatur	20 - 22°C
Schüttelzeit	15 Min.
Zentrifuge	15 Min. (3000 U./Min.)
Volumen	5 ml

Tabelle 8 stellt ein repräsentatives Beispiel für eine größere Anzahl durchgeführter Versuche dar.

T a b e l l e 8

Einfluß der Molarität auf die Adsorption

Molarität	NaCl g	c Lf	c' Lf	x Lf
	0	300	200	100
0,1	0,0292	300	200	100
0,2	0,0584	300	200	100
0,25	0,073	300	200	100
0,28	0,0818	300	220	80

Ergebnis: Betrachtet man die in den einzelnen Versuchsansätzen erhaltenen Werte für die adsorbierten Lf-Einheiten, so zeigt sich, daß bis zu einer Molarität von 0,25 keine Beeinträchtigung der Adsorption stattfindet. Bei der Molarität von 0,28 ist dies aber schon der Fall.

f) Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf die Adsorption

In verschiedenen Temperaturbereichen wird die Adsorptionsabhängigkeit festgestellt. Ein elektrischer Thermostat hält

die bestimmte Temperatur konstant. Blindversuche werden für jeden Temperaturbereich parallel zu den Hauptversuchen durchgeführt.

Lf-Konzentration	300 Lf/5 ml
γ -Aluminiumoxyd	3 mg/5 ml
pH-Wert	6,0
Schüttelzeit	15 Min.
Zentrifuge	15 Min. (3000 U./Min.)
Volumen	5 ml

T a b e l l e 9

Einfluß der Temperatur auf die Adsorption

Temperatur °C	c Lf	c' Lf	x Lf
5	300	190	110
10	300	190	110
20	300	190	110
30	300	190	110

Bei der Durchführung des Blindversuchs bei einer Temperatur von 40°C trat eine Titeränderung der Lösung ein.

Ergebnis: In den Temperaturbereichen von 5, 10, 20 und 30°C ist keine Abhängigkeit der Adsorption von Diphtherie-Toxoid an γ -Aluminiumoxyd festzustellen.

g) Aufnahme der Adsorptionsisotherme nach FREUNDLICH (30)
für das System Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd

In den vorhergehenden Abschnitten sind die Voraussetzungen für die Aufnahme der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme untersucht und herausgefunden worden.

Es soll nun geprüft werden, welche formelmäßigen Beziehungen zwischen den Bestimmungsgrößen des Adsorptionssystems

Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd bestehen.

Als Bestimmungsgrößen sind folgende Faktoren zu berücksichtigen:

- | | |
|---|-------------|
| 1.) Masse des Adsorbens | = m (g) |
| 2.) Menge des adsorbierten
Diphtherie-Toxoids | = x (Lf) |
| 3.) Volumen | = v (l) |
| 4.) Diphtherie-Toxoid-Konzentration vor der Adsorption | = c (Lf/l) |
| 5.) Diphtherie-Toxoid-Konzentration nach der Adsorption | = c' (Lf/l) |
| 6.) Temperatur | |

Die Adsorption wird bei einer konstanten Temperatur von 22°C durchgeführt.

Zwischen den einzelnen aufgeführten Faktoren müssen folgende Beziehungen bestehen:

Nach der FREUNDLICH'SCHEN Adsorptionsisotherme besteht zwischen der adsorbierten Stoffmenge (x), der Masse des Adsorbens (m) und der Konzentration des zu adsorbierenden Stoffes in der Wasserphase nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes (c') folgende Beziehung:

$$\frac{x}{m} = \alpha \cdot c'^{\frac{1}{n}} \quad (1^*)$$

Hierbei sind α und n für jedes System charakteristische Konstanten. Für die Ermittlung dieser Konstanten bei dem vorliegenden Adsorptionssystem wird folgende Bestimmung durchgeführt:

Es wird eine Reihe von Diphtherie-Toxoid-Lösungen (jeweils 5 ml) mit abgestuften Mengen von γ -Aluminiumoxyd als Adsorbens mit 62 300 m²/Mol Oberfläche versetzt. Dann bestimmt man nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes, das durch ausreichende Durchmischung des Systems erreicht wird,

die Konzentration an Lf-Einheiten in der Wasserphase (c') in der schon beschriebenen Weise. Die adsorbierte Menge an Lf-Einheiten läßt sich bei Kenntnis der vor der Adsorption in der Wasserphase vorhandenen Konzentration (c) und ihres Volumens (v) folgendermaßen berechnen:

$$x = (c - c') \cdot v \quad (2^*)$$

T a b e l l e 10

Aufnahme der Adsorptionsisotherme des Systems Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd ($62\ 300\ m^2/Mol$ Oberfläche)

Ansatz	m g	c Lf/l	c' Lf/l	v l	x Lf
1	0,0008	60 000	54 00	0,005	30
2	0,001	60 000	52 000	0,005	40
3	0,002	60 000	46 000	0,005	70
4	0,0026	60 000	40 000	0,005	100
5	0,003	60 000	38 000	0,005	110
6	0,0036	60 000	34 000	0,005	130
7	0,004	60 000	32 000	0,005	140
8	0,005	60 000	26 000	0,005	170
9	0,006	60 000	22 000	0,005	190
10	0,007	60 000	16 000	0,005	220
11	0,008	60 000	12 000	0,005	240

Schüttelzeit 15 Min.
 Zentrifuge 15 Min. (3000 U./Min.)
 pH-Wert 6,0

Man kennt die zu einer Reihe von Werten für den Quotienten adsorbierte Diphtherie-Toxoid-Substanz/Masse des Adsorbens

gehörenden Werte für die Gleichgewichtskonzentration, d.h. man kennt

$$\frac{x}{m} = f(c') \quad (3*)$$

In Tabelle 11 sind die Werte für $\log c'$ und $\log \frac{x}{m}$ angegeben.

T a b e l l e 11

Ansatz	$x - (\log c') \text{ Achse}$	$y - (\log \frac{x}{m}) \text{ Achse}$
1	4,73239	4,57403
2	4,71600	4,60206
3	4,66276	4,54407
4	4,60206	4,58503
5	4,57978	4,56427
6	4,53148	4,55764
7	4,50515	4,54407
8	4,41497	4,53148
9	4,34242	4,50060
10	4,20412	4,49732
11	4,07918	4,47712

In Abb. 3 ist das Bild der Funktion

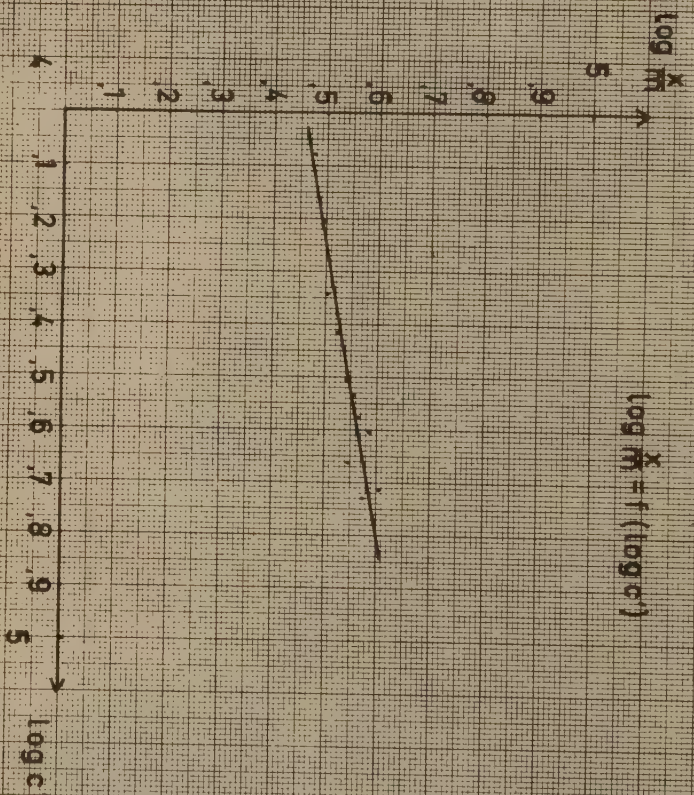
$$\log \frac{x}{m} = f(\log c') \quad (4*)$$

dargestellt.

Aus Abb. 3 folgt, daß ein gradliniger Zusammenhang zwischen der Diphtherie-Toxoid-Beladung des Adsorbens und der Gleichgewichtskonzentration besteht, wenn man die Logarithmen der Variablen als Funktion aufträgt.

Ein Maß für die Strammheit des Zusammenhanges bei den durchgeführten Versuchen ergibt der Korrelationskoeffizient r (KOLLER 45).

Abb. 3



r wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$r = \frac{Sx_1y_1 - N\overline{xy}}{\sqrt{(Sx_1^2 - N\overline{x}^2) \cdot (Sy_1^2 - N\overline{y}^2)}} \quad (5^*)$$

N = Anzahl der Wertepaare

$$x_1 = \log c'$$

$$y_1 = \log \frac{x}{m}$$

$$\overline{x} = \frac{Sx_1}{N}$$

$$\overline{y} = \frac{Sy_1}{N}$$

Statistische Grundeinheit der zu untersuchenden Korrelation ist jedes einzelne Wertepaar x_1, y_1 der Versuchsergebnisse. (x_1 und $\overline{x}$ sind hierbei rein statistische Zahlen, die keine materielle Beziehung zur adsorbierten Diphtherie-Toxoid-Menge x besitzen).

Aus den Versuchsergebnissen folgt:

$$N = 11$$

$$Sx_1 = 49,37031$$

$$Sy_1 = 49,97769$$

$$Sx_1^2 = 222,02443653$$

$$Sy_1^2 = 227,08519614$$

$$\overline{x} = 4,488210$$

$$\overline{y} = 4,543426$$

$$\overline{x}^2 = 20,144029$$

$$\overline{y}^2 = 20,64271981$$

$$N\overline{x}^2 = 221,584319$$

$$N\overline{y}^2 = 227,06991799$$

$$Sx_1y_1 = 224,38591874$$

$$\overline{xy} = 20,39185$$

$$N\overline{xy} = 224,31035$$

$$r = \frac{0,07556874}{\sqrt{0,00672418118}} = \frac{0,07556874}{0,082001}$$

$$r = 0,921$$

Der gefundene Korrelationskoeffizient ist nach KOLLER (45) statistisch gesichert.

Auf Grund dieses Ergebnisses ist bewiesen, daß für das untersuchte Adsorptionssystem die Freundlich'sche Adsorptionsisotherme gilt. Es bestehen also gesetzmäßige Beziehungen zwischen der Beladung des Adsorbens mit Diphtherie-Toxoid $\frac{x}{m}$ und der Gleichgewichtskonzentration c' , die der Gleichung (1) entsprechen:

$$\frac{x}{m} = \epsilon \cdot c'^{\frac{1}{n}}$$

Logarithmiert man diese Gleichung, so erhält man

$$\log \frac{x}{m} = \log \epsilon + \frac{1}{n} \log c' \quad (6*)$$

Dies ist die Gleichung der Geraden, die der in Abbildung 1 dargestellten Funktion

$$\log \frac{x}{m} = f(\log c')$$

entspricht.

Die Ermittlung der Konstanten n und ϵ erfolgt über die Gleichung der Geraden. $1/n$ ist der Anstieg, $\log \epsilon$ die Verschiebung der Geraden. Die Berechnung dieser Größen erfolgt auf Grund der gesicherten Korrelation der Meßwerte durch Glättung mittels der Methode der kleinsten Quadrate. Der Anstieg und die Verschiebung der zugrunde liegenden Regressionsgeraden werden errechnet.

Die allgemeine Formel der Regressionsgeraden lautet:

$$Y = bx + a \quad (7*)$$

Hierbei ist der Regressionskoeffizient

$$b = \frac{1}{n}$$

und die Verschiebung der Regressionsgeraden

$$a = \log \mathcal{L}$$

der gesuchten Geraden

$$\log \frac{x}{m} = \frac{1}{n} (\log c') + \log \mathcal{L}$$

Y und x der Regressionsgeraden sind demnach $\log \frac{x}{m}$ und $\log c'$.

Die Berechnung des Regressionskoeffizienten b erfolgt nach der Gleichung (LINDER 48):

$$b = \frac{Sx_1y_1 - N\overline{xy}}{Sx_1^2 - N\overline{x}^2} \quad (8^*)$$

Setzt man die bei der Ermittlung des Korrelationskoeffizienten errechneten Größen in Gleichung (8*) ein, erhält man

$$b = \frac{0,07556874}{0,4401175}$$

$$b = 0,1717$$

Die Berechnung des Parameters a der Regressionsgeraden erfolgt nach der Formel (LINDER 48):

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Setzt man auch hier die bei der Ermittlung des Korrelationskoeffizienten errechneten Größen ein, so ergibt sich

$$a = 4,543426 - 0,1717 \cdot 4,48821$$

$$a = 3,772801$$

Damit sind Anstieg und Verschiebung der Regressionsgeraden

ermittelt.

Da nach Gleichung (7*) b gleich $1/n$ und a gleich $\log \alpha$ ist, ergibt sich für:

$$\frac{1}{n} = 0,1717$$

$$\log \alpha = 3,772801$$

Die allgemeine Gleichung für die bei der Adsorption von Diphtherie-Toxoid an γ -Aluminiumoxyd zugrunde liegende Gesetzmäßigkeit lautet:

$$\log \frac{x}{m} = 0,1717 \cdot \log c' + 3,772801$$

Es ergeben sich daraus folgende Werte für die Konstanten der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme des vorliegenden Adsorptionssystems Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd:

$$\frac{1}{n} = 0,1717$$

$$n = 5,824$$

$$\alpha = 5926,6$$

Bei Kenntnis der Konstanten α und n ist es möglich, den zu jedem Wert für die Gleichgewichtskonzentration gehörenden Wert für den Quotienten aus adsorbierter Diphtherie-Toxoid-Substanz und Masse des Adsorbens anzugeben.

IV. Impfstoffherstellung

Die Grundlagen für die Herstellung des Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoffes wurden in den vorhergehenden Adsorptionsversuchen ermittelt. Außer diesem Depot-Impfstoff waren die beiden Vergleichsimpfstoffe, ein Diphtherie-Toxoid-Aluminiumhydroxyd-Adsorbat-Impfstoff sowie ein Diphtherie-Toxoid-Impfstoff ohne Depot-Materialzusatz herzustellen.

Diese drei Impfstoffe sollen keimfrei und injizierbar sein, um sie anschließend im Tierversuch zu erproben.

a) Impfstoff I: Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoff

Es wurden 50 ml Impfstoff I hergestellt.

In eine sterilisierte 200 ml Pulverflasche wurden 500 mg γ -Aluminiumoxyd analytisch genau eingewogen und mit Heißluft sterilisiert. 25 ml sterile Diphtherie-Toxoid-Lösung (60 I.f./ml) und 25 ml einer sterilen Verdünnungsflüssigkeit folgender Zusammensetzung wurden unter sterilen Bedingungen zugesetzt:

γ -Gelatine-Lösung (10%)	2 ml
Natriumchlorid	0,85 g
n/10 Salzsäure	0,8 ml
Aqua dest.	ad 50,0 ml

Der Zusatz der γ -Gelatine wurde aus galenischen Gesichtspunkten getroffen, um der Suspension eine bessere Homogenität zu verleihen.

Die Adsorption wurde so durchgeführt, indem die Pulverflasche mit dem Impfstoff 20 Minuten bei 22°C geschüttelt wurde (200 Schwingungen/Min.).

Der p_H -Wert des Impfstoffes lag bei 6,85.

Es schloß sich eine Sterilitätsprüfung an:

- 1.) 0,25 ml Impfstoff I wurden auf einer sterilen Agar-Platte ausgestrichen und 12 Std. bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

- 2.) 1 ml Impfstoff wurde in 5 ml sterile Nährbouillon gegeben und 12 Std. bei 37°C im Brutschrank belassen.

Die Impfstoffproben erwiesen sich als steril.

Der Impfstoff I wurde bis zur Injektion bei 4-5°C aufbewahrt.

Zusammensetzung Impfstoff I:

In 1 ml Impfstoff I waren 10 mg γ -Aluminiumoxyd als Adsorbens und 30 Lf Diphtherie-Formol-Toxoid als Antigen enthalten.

b) Impfstoff II: Diphtherie-Toxoid-Aluminiumhydroxyd-Adsorbat-Impfstoff

Es wurden 50 ml Impfstoff II hergestellt.

6,4 ml Aluminiumhydroxyd-Suspension wurden in eine sterilierte 200 ml Pulverflasche pipettiert. Die Flasche mit der Suspension wurde dann bei 120°C, 1 atü 30 Minuten im Autoklaven sterilisiert. Unter sterilen Bedingungen wurden 25 ml sterile Diphtherie-Formol-Toxoid-Lösung (60Lf/ml) zugesetzt. Der Ansatz wurde mit 18,6 ml einer sterilen Verdünnungsflüssigkeit folgender Zusammensetzung aufgefüllt:

Natriumchlorid	0,456 g
n/10 Natronlauge	0,19 ml
Aqua dest.	ad 20,0 ml

Zur Durchführung der Adsorption wurde die Pulverflasche 20 Minuten bei 22°C maschinell geschüttelt (220 Schwingungen pro Min.).

Der p_H -Wert des Impfstoffes II lag bei 6,9.

Die Sterilitätsproben wurden wie bei Impfstoff I durchgeführt. Beide Impfstoffproben erwiesen sich als steril.

Der Impfstoff II wurde bis zur Injektion bei 4-5°C aufbewahrt.

Zusammensetzung Impfstoff II:

In 1 ml Impfstoff II waren 30 Lf Diphtherie-Formol-Toxoid als Antigen und 3,82 mg Aluminiumhydroxyd, das entspricht einem Gehalt von 2,5 mg Aluminiumoxyd pro 1 ml Impfstoff, als Adsorbens enthalten. Diese Zusammensetzung, in bezug auf Menge des Antigens und des Adsorbens, haben die im Handel befindlichen Diphtherie-Formol-Toxoid-Adsorbat-Impfstoffe.

c) Impfstoff III: Diphtherie-Toxoid-Impfstoff, ohne Adsorbenszusatz

Es wurden 35 ml Impfstoff III hergestellt.

In eine sterilisierte 200 ml Pulverflasche wurden 17,5 ml sterile Diphtherie-Formol-Toxoid-Lösung (60 Lf/ml) pipettiert und 17,5 ml sterile Natriumchloridlösung folgender Zusammensetzung zugesetzt:

Natriumchlorid	0,85 g
$n/10$ Natronlauge	0,5 ml
Aqua dest.	ad 50,0 ml

Der p_H -Wert des Impfstoffes III lag bei 7,0.

Es wurden ebenfalls Sterilitätsproben wie bei Impfstoff I durchgeführt. Beide Impfstoffproben erwiesen sich als steril.

Der Impfstoff III wurde bis zur Injektion bei 4-5°C aufbewahrt.

Zusammensetzung Impfstoff III:

In 1 ml Impfstoff III waren 30 Lf Diphtherie-Formol-Toxoid als Antigen, aber k e i n Adsorbens enthalten.

V. Tierversuche

Als Tiermaterial wurden Meerschweinchen für den Vergleich der drei hergestellten Impfstoffe ausgewählt. Vor dem Versuch standen 90 Tiere 14 Tage bei normaler Pflege. Vor der Injektion wurden sie in Impfstoffgruppen eingeteilt, gewogen und an der seitlichen Bauchhaut rasiert.

a) Injektion

In die seitliche, rasierte Bauchhaut der Meerschweinchen wurde 1 ml des bestimmten Impfstoffes s u b k u t a n injiziert. Es wurden hierfür Kanülen Nr. 12 verwendet.

Das histologische Bild eines sich entwickelnden Aluminiumoxyd-Granuloms zeigt Abb. 4:

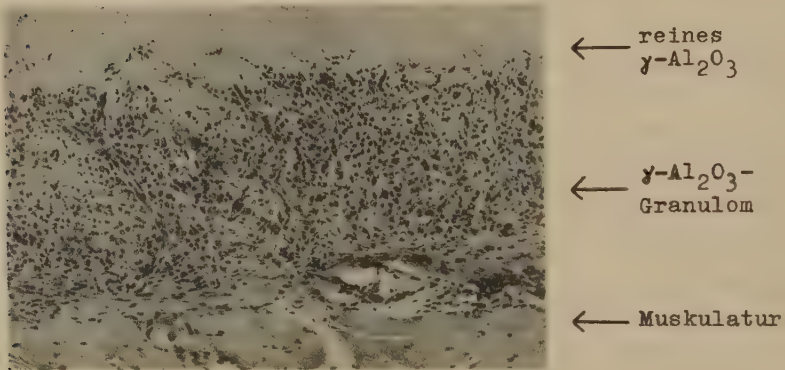


Abb. 4

Aufnahme nach VOSS (49). HE, 120x

Abb. 4 zeigt einen Ausschnitt vom Rand eines 7 Tage alten γ -Aluminiumoxyd-Depot-Querschnitts. Es sind deutlich das γ -Aluminiumoxyd, die beginnende Granulombildung sowie die angrenzende Muskelfaserschicht zu sehen.

b) Blutentnahme und Serumbereitung

Die Tiere wurden nach der Injektion in bestimmten Zeitabständen (6-90 Tage) durch Entbluten aus der Halsschlagader oder durch Herzpunktion getötet. Das Blut wurde in sterilen Röhrchen gesammelt. Nach der Bildung des Blutkuchens wurde abgestochen, das Serum in sterile Zentrifugierröhrchen gefüllt und zentrifugiert. Das zentrifugierte Serum wurde

dann in Ampullen gefüllt und eingefroren. Von jedem Meer-schweinchen wurden ca. 2-6 ml Serum gewonnen. Die Seren waren bis auf wenige Ausnahmen nicht hämolytisch.

Tierverluste waren während des Versuchs nicht zu verzeichnen!

VI. Serologische Untersuchung

Die neunzig angefallenen Seren wurden auf ihren Gehalt an Diphtherie-Antitoxin-Einheiten (IE)/ml untersucht.

Für diese Reihenuntersuchung kam nur "die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherie-Toxin und -Antitoxin" nach CLAUS JENSEN (31) in Frage. Diese Methode ist aufgebaut auf die Bestimmung der LR- bzw. LR/3000-Dosis. Unter LR-Dosis versteht CLAUS JENSEN diejenige kleinste Toxin-Menge, die mit 1 Antitoxineinheit (IE) gemischt, nach vierstündiger Bindung bei 37°C im Wasserbad einem weißen Kaninchen in die depilierte Rückenhaul in einem Gesamtvolumen von 0,1 ml ($p_H=7,4$) intrakutan eingespritzt, nach 36-48 Stunden eine Hautreaktion, die als Rötung mit einem Durchmesser von 8-10 mm (8-10r) gemessen wird, hervorruft.

Die durch das intrakutan eingeführte Diphtherie-Toxin hervorgerufene Hautreaktion ist streng spezifisch und kann daher durch eine entsprechende Menge Antitoxin aufgehoben werden. Der quantitative Nachweis von Antitoxin beruht bei der intrakutanen Kaninchenmethode auf diesem Verhältnis.

Das Prinzip ist folgendes:

Man präpariert eine Serie von Gemischen der gleichen Toxinmenge mit fallenden Mengen des zu untersuchenden antitoxinhaltigen Serums und injiziert nach der erforderlichen Bindungszeit 0,1 ml jeder Mischung in die depilierte Kaninchenhaul. An den Stellen, wo hyperneutrale oder neutrale Toxinmischungen injiziert worden sind, sieht man überhaupt keine Reaktionen. Wo dagegen Gemische injiziert wurden, bei denen die zugesetzten Serummengen das zur vollständigen Neutralisierung der angewandten Toxin-Test-Dosis erforderliche Antitoxin nicht enthalten haben, treten stärker werdende Reaktionen auf, die sich schließlich an Intensität der von der Toxinmenge allein (ohne Antitoxin) bewirkten Reaktion nähern. Ist nun der indirekte Giftwert der benutzten Toxinmenge, d.h. dessen Verhältnis zur Antitoxineinheit oder zu irgendeinem

uchteil derselben, bekannt, so kann der antitoxische Wert des untersuchten Serums von einer derartigen Versuchsreihe abgelesen werden. Ist beispielsweise die benutzte Test-Dosis LR/3000 gewesen, so enthält die Menge des untersuchten Serums, die mit dieser Toxin-Menge vermischt und injiziert die festgesetzte Grenzreaktion: 8-10 r hervorruft, gerade 1/3000 IE, vorausgesetzt, daß die angewandte Toxinmenge bei Injektion zusammen mit 1/3000 IE des Standard-Antitoxins am gleichen Kaninchen dieselbe Hautreaktion ergibt.

Die praktische Titration von Antitoxin an Kaninchen wird am besten auf dem LR/3000-Niveau vorgenommen. Bei Anwendung einer kleineren Toxinmenge wird die Auswertung ungenauer. Benutzt man eine größere Toxinmenge, so wird die Genauigkeit größer, doch wird dadurch gleichzeitig die Anzahl der Injektionen, die ohne Nachteil gemacht werden können, erheblich reduziert. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Reaktionen an Größe zunehmen und infolgedessen die Felder bei der Einteilung der Haut vergrößert werden müssen, zum Teil aber auch dem Umstand zuzuschreiben, daß die Kaninchen naturgemäß nicht unbeschränkte Toxinmengen intrakutan ertragen können. Die für die Kaninchen tödliche intrakutane Toxindosis variiert stark. Im allgemeinen sollte die gesamte "freie" Toxinmenge, die injiziert wird, 8-10 D.l.m. (Dosis letalis minima) nicht übersteigen, da das Kaninchen sonst schlechte Reaktionen zeigt oder stirbt. Mit LR/3000 als Test-Dosis kann man ohne Gefahr bis zu 200 Injektionen pro Kaninchen vornehmen, da die gesamte injizierte Toxinmenge $200 \times \text{LR/3000-Dosen}$ selbst für sehr giftige Toxine höchstens ca. 4-5 D.l.m. ausmachen wird. Aus diesem Grund arbeitet CLAUS JENSEN mit der LR/3000-Dosis und dementsprechend mit 1/3000 IE. Die LR/3000-Dosis stellt die kleinste Toxinmenge dar, die mit 1/3000 IE unter den gleichen Bedingungen die gleichen Reaktionen hervorruft wie die LR-Dosis mit 1 IE.

Die Herstellung der Injektionslösungen wurde nach folgenden Schemata, die aus der Arbeit von CLAUS JENSEN (31) entnommen wurden, durchgeführt:

T a b e l l e 12

Auswertungsschema Ia

Serum		Pufferlösung $p_H=7,4$ ml	Test-Toxin Verdünnung $0,1\text{ml}=3 \times \text{LR}/(3000)\text{m}$	IE pro ml Serum
Verdünnung	Menge ml			
unverdünnt	0,20	0	0,10	0,005
	0,10	0,10	0,10	0,01
	0,05	0,15	0,10	0,02
1 : 10	0,20	0	0,10	0,05
	0,10	0,10	0,10	0,1
	0,05	0,15	0,10	0,2
1 : 80	0,20	0	0,10	0,4
	0,10	0,10	0,10	0,8
	0,05	0,15	0,10	1,6

T a b e l l e 13

Auswertungsschema Ib

Serum		Pufferlösung $p_H=7,4$ ml	Test-Toxin Verdünnung $0,1\text{ml}=3 \times \text{LR}/(3000)\text{m}$	IE pro ml Serum
Verdünnung	Menge ml			
1 : 200	0,20	0	0,10	1,0
	0,10	0,10	0,10	2,0
	0,05	0,15	0,10	4,0
1 : 2000	0,20	0	0,10	10
	0,10	0,10	0,10	20
	0,05	0,15	0,10	40
1 : 16000	0,20	0	0,10	80
	0,10	0,10	0,10	160
	0,05	0,15	0,10	320

Die von einer konstanten Antitoxinmenge neutralisierte Menge Toxin, z.B. die LR/3000-Dosis, variiert etwas bei verschiedenen Kaninchen. Umgekehrt muß deshalb die zur Neutralisierung einer konstanten Toxinmenge - beispielsweise die LR/3000-Dosis - erforderliche Menge Antitoxin bei der Auswertung an verschiedenen Kaninchen ebenfalls etwas schwanken. Bei der Auswertung desselben Serums an verschiedenen Kaninchen ergeben sich mehr oder weniger verschiedene Werte. Um den genauen Titer des Serums bestimmen zu können, müßte man Messungen an mehreren Kaninchen vornehmen und das arithmetische Mittel der Resultate ziehen.

Durch Einführung der K o n t r o l l r e i h e an jedem bei der Auswertung benutzten Kaninchen kann man diese Schwierigkeit umgehen.

Die individuellen Variationen bei den Versuchstieren und die dadurch bedingten Schwankungen der Ergebnisse werden durch die Kontrollreihe ausgeschaltet.

Die Kontrollreihe (Tabelle 14) besteht aus einer Serie von 11 Gemischen der bei der Titration angewandten konstanten Test-Toxinmenge (3 x LR/3000-Dosis) mit fallenden Dosen der Diphtherie-Standard-Serum-Verdünnung (0,1 ml=1/1000 IE). Diese Serie von Gemischen wird gleichzeitig mit allen übrigen Mischungen, bestehend aus den im Versuch untersuchten Seren und der konstanten Toxin-Test-Dosis, auf die gleiche Weise hergestellt, behandelt und zu gleicher Zeit an demselben Kaninchen injiziert. Unter einheitlichen Untersuchungsbedingungen wird erreicht, daß die für den gewünschten Neutralisierungsgrad der Toxin-Test-Dosis erforderliche Standard-Antitoxinmenge für das Kaninchen, das bei der Auswertung der unbekannten Seren verwandt wird, festgelegt wird. Mit dem Ergebnis der Kontrollreihe, der sogenannten K o r r e k t i o n , muß der gefundene Titer der untersuchten Seren korrigiert werden, um die Titerergebnisse durch individuelle Variationen der Kaninchen nicht zu beeinflussen.

Für die vorliegende Arbeit standen als Diphtherie-Test-Toxin das Diphtherie-Test-Toxin T 1822 des Paul-Ehrlich-Instituts, Frankfurt am Main, zur Verfügung.

Bei dem Diphtherie-Test-Toxin T 1822 betrug

$$3 \times \text{LRm}(1/3000 \text{ IE}) = 0,00034 \text{ mg.}$$

Das für die Kontrollreihe erforderliche Diphtherie-Standard-Serum stand ebenfalls vom Paul-Ehrlich-Institut zur Verfügung. Es handelte sich hierbei um das Diphtherie-Standardserum Ds 75, in dem in 1 ml 10 IE enthalten waren. *)

Für die Herstellung der Lösungen standen die erforderliche Semimikrowaage sowie die notwendigen, amtlich geeichten Pipetten zur Verfügung.

Bei der Auswertung der Seren entsprach die Serum-Nummer der Tier-Nummer.

Beispiel der Auswertung von Serum Nr.193 nach Schema Ia:

Etwa 8 Tage vor der Injektion wurde der Rücken des Kaninchens Nr. 4 enthaart und täglich mit Zinksalbe eingerieben. Am letzten Tag vor der Injektion erfolgt die Einteilung der depilierten Haut in 2 cm x 2 cm große quadratische Felder. Die nach Auswertungsschema Ia hergestellten Injektionslösungen wurden vier Stunden in ein Wasserbad von 37°C gestellt; die Lösungen waren dann injektionsbereit. Das vorbereitete Kaninchen wurde auf einem "Kaninchenbrett" angebracht und die Feldereinteilung der Rückenhaut im Protokoll genau festgehalten. Die intrakutane Injektion wurde vorgenommen und die Nummer des betreffenden Röhrchens mit der Injektionslösung in das entsprechende Feld des Protokolls eingetragen.

*) Für die Bereitstellung des Diphtherie-Testgiftes und des Diphtherie-Standardserums durch das PAUL-EHRLICH-INSTITUT, Frankfurt am Main, sei

Herrn Direktor Prof.Dr.Dr.h.c. R.Prigge
besonders gedankt.

Abb. 5, 6 und 7 zeigen die Durchführung der intrakutanen Injektion.



Abb. 5



Abb. 6

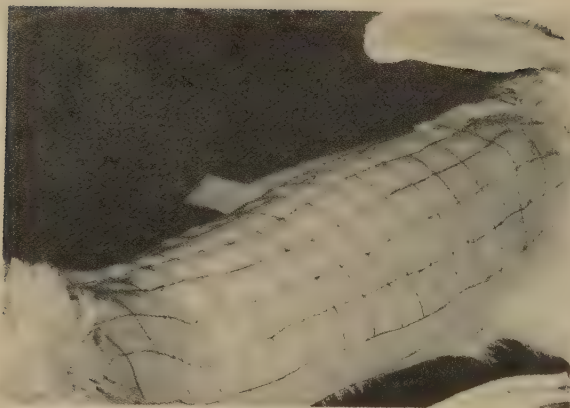


Abb. 7

Die Ablesung erfolgte nach 36-48 Stunden (Abb. 8).

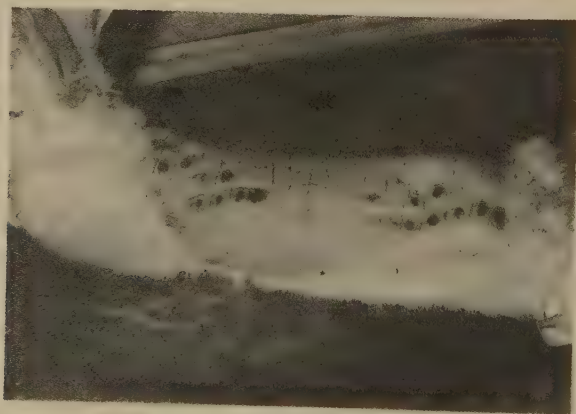


Abb. 8

Die Größe der Reaktion (durchschnittlicher Durchmesser) wurde gemessen und in Millimetern aufgeführt. Das Aussehen und der Charakter der Reaktionen wurden durch folgende Zeichen angegeben:

- O = keine Reaktion
 r = schwache, aber sichere Rötung
 R = kräftige Rötung
 i = schwache Infiltration
 I = kräftige Infiltration
 n = kleine Nekrose
 N = starke Nekrose

T a b e l l e 14

Versuchsprotokoll Serum Nr. 193

Kontrollreihe	Injekt. Nr.	Stand.-Serum IE i. Mischg.	Ablesung	Korrektion
Test-Toxin- Verdünnung 0,1 ml = 3xLR/(3000)m	1	0,0016	0	0,9
	2	0,0014	0	
	3	0,00125	0	
	4	0,0011	0	
	5	0,0010	0	
	6	0,0009	8r	
	7	0,0008	8R	
	8	0,00071	10R	
	9	0,00063	13R	
	10	0,00056	13RI	
	11	0,00050	15RI	
	Injekt. Nr.	Geprüft für IE pro ml	Ablesung	Erfolg
Serum Nr. 193	127	0,005	0	0,2x0,9 =0,18 IE/ml
	128	0,01	0	
	129	0,02	0	
	130	0,05	0	
	131	0,1	0	
	132	0,2	8r	
	133	0,4	10RI	
	134	0,8	13RI	
	135	1,6	15RI	

Wie die Reaktionen der Kontrollreihe zeigten, "entsprach" die Toxin-Test-Dosis für Kaninchen Nr.4 nicht 0,001 IE, sondern 0,0009 IE des Diphtherie-Standardserums Ds 75. Die Korrektur war somit 0,9.

Die Titerbestimmung des Serums Nr. 193 ergab einen Wert von 0,18 IE/ml. An diese Auswertung nach Schema I könnte sich eine zweite genauere Auswertung anschließen. Diese ist aber im Verlauf dieser Arbeit nicht erforderlich.

In den folgenden Tabellen sind die ermittelten Titer der einzelnen Seren und ihre arithmetischen Mittelwerte aufgezeigt:

T a b e l l e 15

Impfstoff I: Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd

Blutentnahme nach	Serum-Nr.	Gew. vor Blutentn. g	Serum-Titer IE/ml	Titermittelwert IE/ml
6 Tagen	105	465	<0,005	<0,005
	109	510	<0,005	
	153	380	<0,005	
	154	445	<0,005	
	155	390	<0,005	
19 Tagen	104	435	0,25	0,28
	108	455	0,031	
	131	465	0,5	
	132	480	0,075	
	137	485	0,56	
32 Tagen	110	440	0,4	0,65
	111	455	0,4	
	128	580	0,4	
	133	505	0,44	
	138	500	2,0	
	152	490	0,284	
60 Tagen	112	465	0,88	0,74
	113	475	0,72	
	114	490	0,055	
	129	595	0,44	
	130	530	0,9	
	136	545	1,76	
	140	535	0,44	
90 Tagen	106	540	1,136	1,245
	107	520	0,88	
	134	500	1,136	
	135	540	0,88	
	139	595	1,136	
	141	420	0,71	
	142	545	2,84	

T a b e l l e 16

Impfstoff II: Diphtherie-Toxoid - Aluminiumhydroxyd

Blutent- nahme nach	Serum- Nr.	Gew. vor Blutentn. g	Serum-Titer IE/ml	Titermitt.- Wert IE/ml
6 Tagen	118	370	<0,005	<0,005
	121	375	<0,005	
	161	450	<0,005	
	163	475	<0,005	
	166	490	<0,005	
19 Tagen	120	365	0,568	0,4
	125	385	0,36	
	165	470	0,28	
	168	465	0,54	
	171	485	0,28	
32 Tagen	115	425	0,88	0,59
	124	405	0,4	
	172	490	0,2	
	162	495	1,136	
	169	490	0,8	
	158	455	0,14	
60 Tagen	116	470	0,9	0,92
	117	475	0,9	
	119	485	1,76	
	160	545	0,9	
	164	540	0,72	
	170	590	0,9	
	173	590	0,36	
90 Tagen	122	495	0,568	0,85
	123	545	0,71	
	156	495	1,42	
	157	535	0,71	
	159	500	0,568	
	167	460	0,568	
	174	620	1,42	

T a b e l l e 17

Impfstoff III: Diphtherie-Toxoid, ohne Adsorbens

Blutent- nahme nach	Serum- Nr.	Gew. vor Blutentn. g	Serum-Titer IE/ml	Titermitt.- Wert IE/ml
6 Tagen	143	395	<0,005	<0,005
	144	360	<0,005	
	175	480	<0,005	
	180	485	0,035	
	187	520	<0,005	
19 Tagen	146	375	<0,005	0,03
	149	370	0,0355	
	182	430	0,0355	
	185	450	0,0071	
	190	490	0,071	
32 Tagen	145	385	0,035	0,068
	147	425	0,142	
	176	420	0,035	
	178	430	0,05	
	183	480	<0,005	
	189	445	0,142	
60 Tagen	126	420	<0,005	0,061
	148	420	0,2	
	151	420	0,02	
	181	505	<0,005	
	184	460	<0,005	
	186	480	0,014	
	193	470	0,18	
90 Tagen	127	420	0,071	0,063
	150	350	<0,005	
	177	485	0,071	
	179	490	0,142	
	188	495	0,142	
	191	480	0,0071	
	192	530	0,0071	

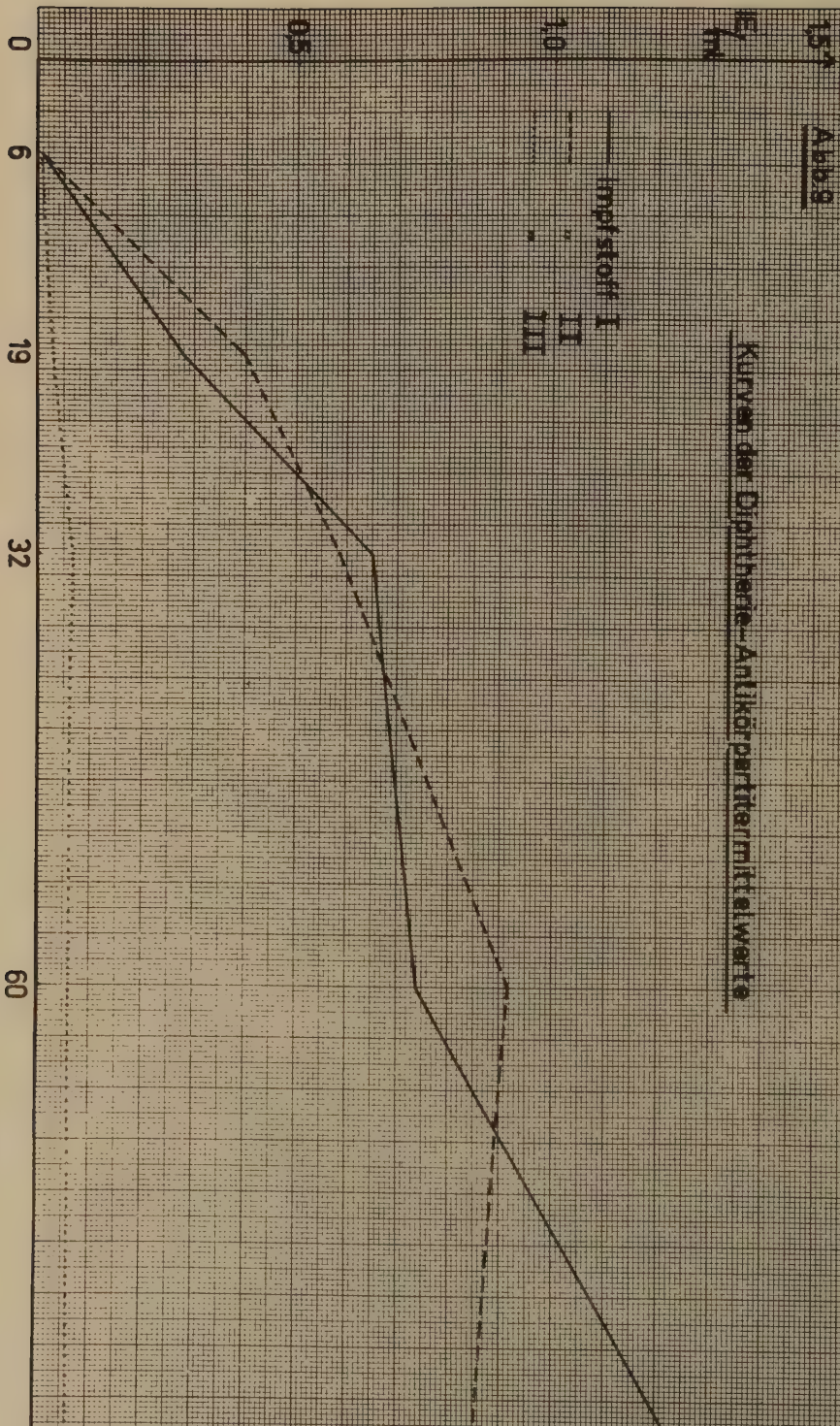
In der folgenden Abb. 9 sind die arithmetischen Mittelwerte der Antikörpertiter der Meerschweinchen für die drei Impfstoffe in Abhängigkeit zur zeitlichen Blutentnahme graphisch aufgetragen.

In Abb. 10, 11, 12 und 13 sind die Antikörpertiter der einzelnen Seren sowie der für die bestimmte Blutentnahme ermittelte arithmetische Titermittelwert aufgetragen. In diesen Abbildungen kommen die Streuungen innerhalb der einzelnen Gruppen zum Ausdruck.

Abb. 9

Kurven der Diphtherie-Antikörpermittelmerte

impfstoff I
II
III



Blutentnahme nach 19 Tagen

Abb 10

Impfstoff I

Impfstoff II

Einzeltiler

Titermittelwert

Einzeltiler

Titermittelwert

IE/ml

IE/ml

1.0

0.8

0.6

0.4

0.2

0

1.0

0.8

0.6

0.4

0.2

0

104

108

131

132

137

120

125

165

168

171

Serum Nr.

Serum Nr.

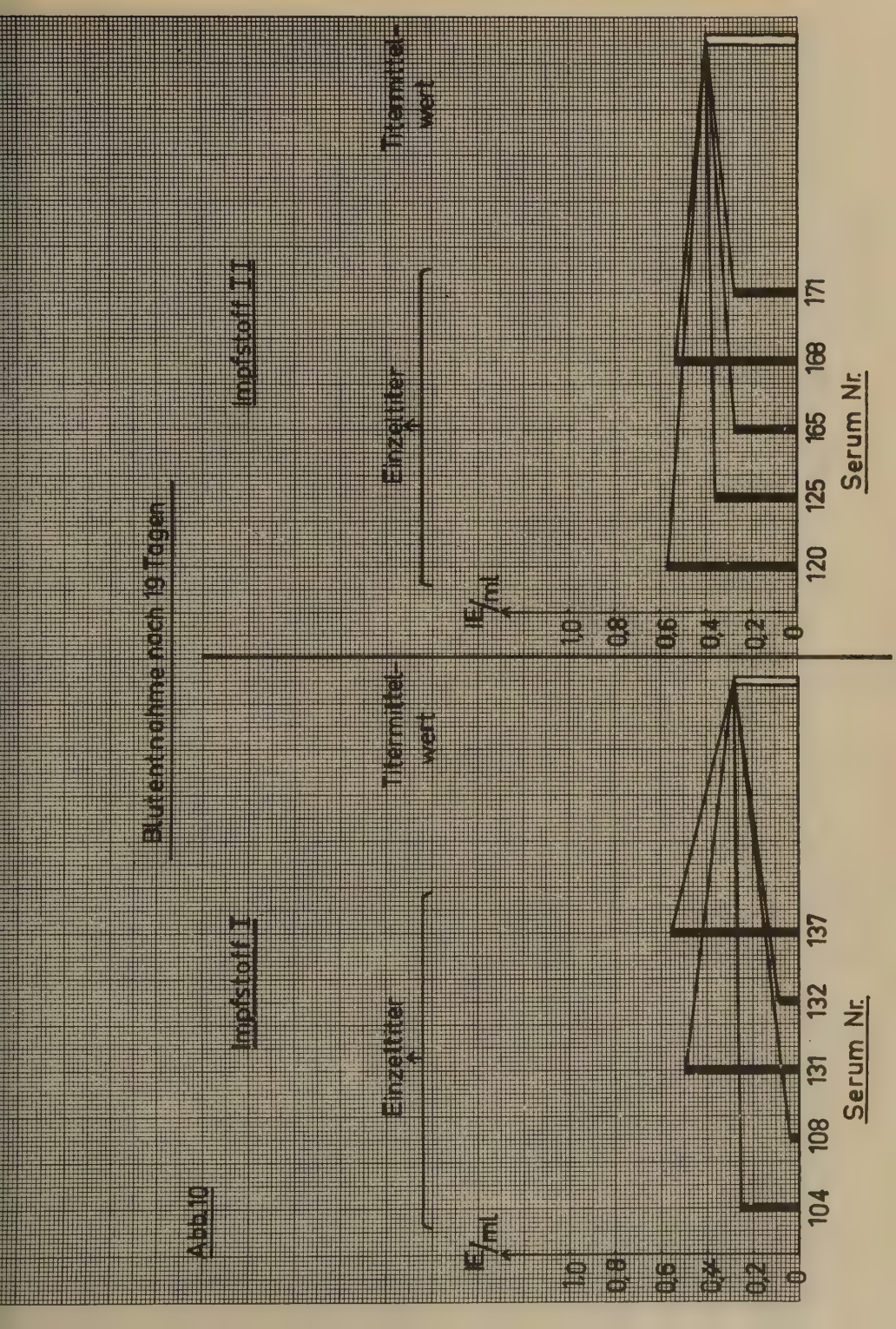
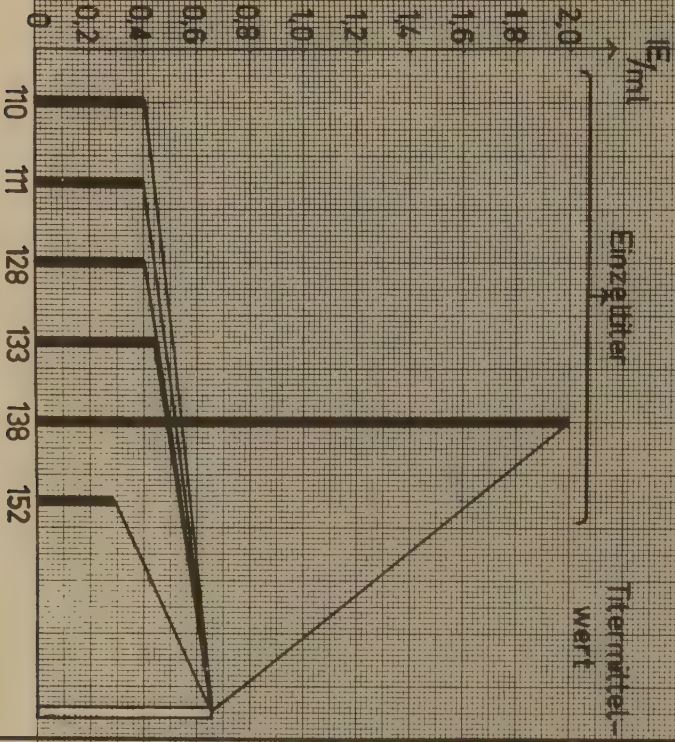


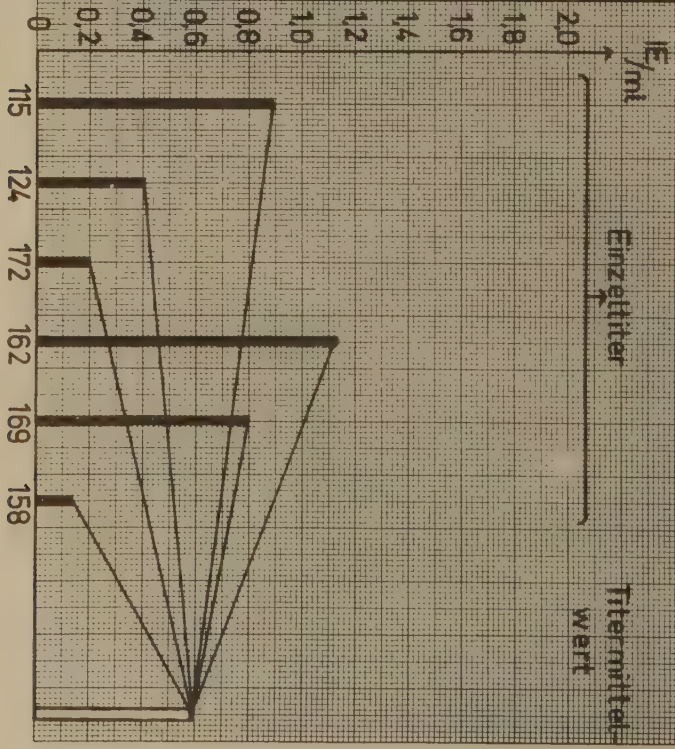
Abb. 11

Blutentnahme nach 32 Tagen

Impfstoff I



Impfstoff II



Blutentnahme nach 60 Tagen

Abb. 12

Impfstoff I

Impfstoff II

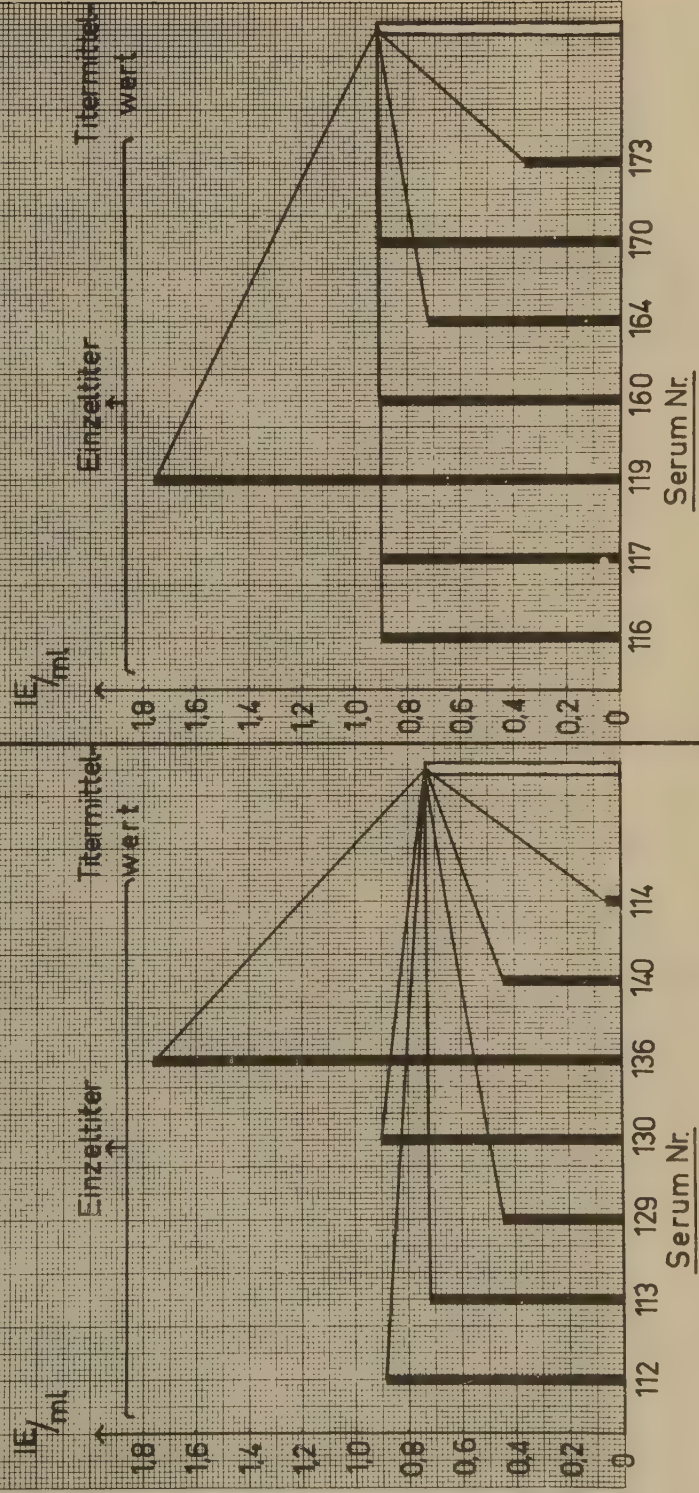
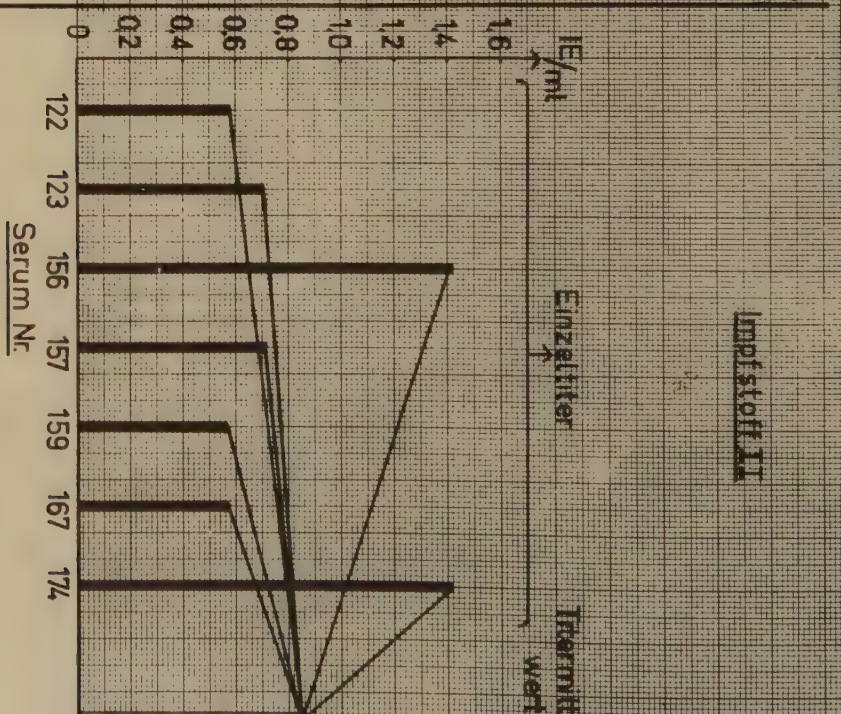
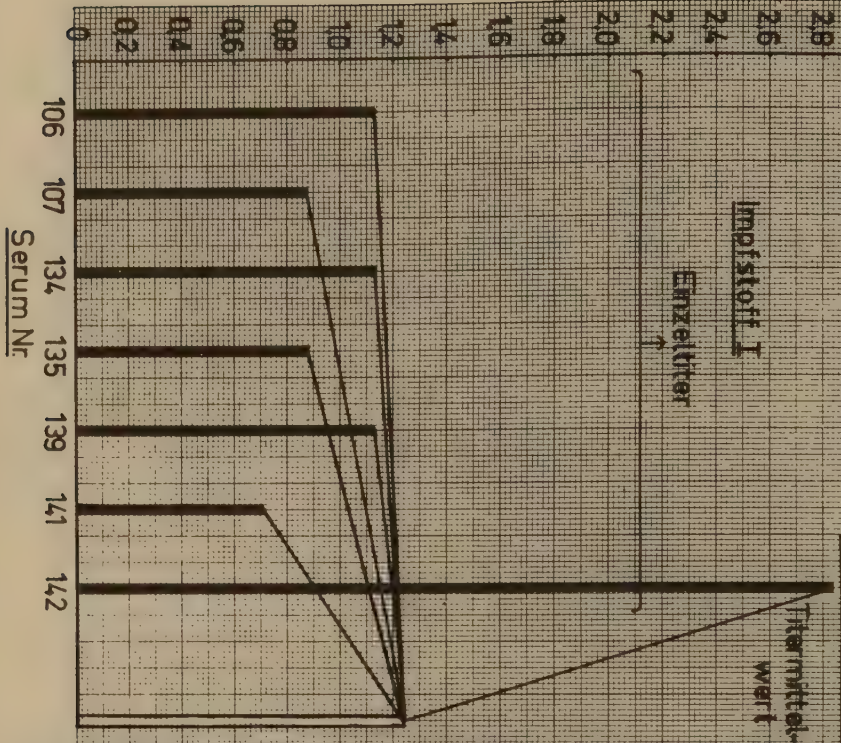


Abb.13

Blutentnahme nach 90 Tagen



VII. Statistische Auswertungen

a) DUNCAN - Test (50)

Durch die statistische Auswertung mit Hilfe des DUNCAN-Testes soll gezeigt werden, zu welchem Zeitpunkt der Versuchsdauer signifikante Antikörper-Titer-Differenzen zwischen den drei Tierversuchsgruppen bestehen.

Für die vorliegende Auswertung wurden die Titerergebnisse nach 90 und 60 Tagen Versuchsdauer herangezogen.

Titerergebnisse nach 90 Tagen:

T a b e l l e 18

Einzeltiler und ihre Quadrate

Impfstoff I γ - Al_2O_3		Impfstoff II $\text{Al}(\text{OH})_3$		Impfstoff III ohne Adsorbens	
x	x^2	x	x^2	x	x^2
1,136	1,290496	0,568	0,322624	0,071	0,005041
0,88	0,7744	0,71	0,5041	0,005	0,000025
1,136	1,290496	1,42	2,0164	0,071	0,005041
0,88	0,7744	0,71	0,5041	0,142	0,020164
1,136	1,290496	0,568	0,322624	0,142	0,020164
0,71	0,5041	0,568	0,322624	0,0071	0,000050
2,84	8,0656	1,42	2,0164	0,0071	0,000050
$k_1 =$	$Sx_1^2 =$	$k_2 =$	$Sx_2^2 =$	$k_3 =$	$Sx_3^2 =$
8,718	13,989988	5,964	6,008872	0,4452	0,050535

x = Einzeltiler

x^2 = Quadrate der Einzeltiler

k = Summe der Einzeltiler pro Impfstoff

Sx^2 = Summe der Quadrate der Einzeltiler pro Impfstoff

A = Summe aller Einzeltiler = $k_1 + k_2 + k_3 = 15,1272$

Sx_{1-3}^2 = Summe aller Quadrate der Einzeltiter

$$Sx_{1-3}^2 = Sx_1^2 + Sx_2^2 + Sx_3^2 = 20,049395$$

Sk_{1-3}^2 = Summe der Quadrate der k-Werte = 111,771023

r = Anzahl der Titerwerte pro Impfstoff = 7

N = Anzahl der insgesamt vorhandenen Titerwerte = 21

N_r = Anzahl der Versuchsreihen (Impfstoffe) = 3

Gang der Berechnung :

1.) Berechnung des Korrekturgliedes K:

$$K = \frac{A^2}{N} = \frac{228,83217984}{21}$$

$$K = 10,89677046$$

2.) Berechnung des Abweichungsquadrates (SAQ) insgesamt:

$$SAQ_{\text{insgesamt}} = Sx_{1-3}^2 - K = 20,049395 - 10,89677046$$

$$SAQ_{\text{insgesamt}} = 9,152624$$

3.) Berechnung von SAQ zwischen den Reihen:

$$SAQ_{\text{zwischen}} = \frac{Sk_{1-3}^2}{r} - K = \frac{111,771023}{7} - 10,89677046$$

$$SAQ_{\text{zwischen}} = 5,070518$$

4.) Folgendes Schema wird aufgestellt:

Variabilität	SAQ	Freiheitsgrade	Varianz
Gesamt	9,152624	$N - 1 = 20$	
zwischen	5,070518	$N_r - 1 = 2$	
innerhalb	4,082106	18	s^2

$$s^2 = \frac{SAQ_{\text{innerhalb}}}{(N-1)-(N_r-1)} = \frac{4,082106}{18} = 0,226783$$

$$s = \sqrt{0,226783} = 0,4762$$

Die Varianz hat die Größe von 0,4762.

5.) Berechnung von K' :

$$K' = \frac{\sqrt{r}}{s} = \frac{\sqrt{7}}{0,4762}$$

$$K' = 5,5579$$

6.) Ermittlung des Wertes t nach der t -Verteilung von "STUDENT" (52) für die Anzahl der Freiheitsgrade n_f und für die Sicherungsgrenze von $P = 5\%$:

$$n_f = (N-1) - (N_r-1) = 18$$

$$P = 5\%$$

$$t = 2,1$$

Die Abweichung t hat den Wert von 2,1.

7.) Berechnung von K'' :

$$K'' = \frac{t}{K'} = \frac{2,1}{5,5579}$$

$$K'' = 0,377$$

8.) Sämtliche Titermittelwerte, deren Differenz größer als K'' ist, weisen einen signifikanten Unterschied auf:

In der folgenden Tabelle 19 sind die Differenzen der Titermittelwerte der drei Tiergruppen, die mit verschiedenen Impfstoffen behandelt wurden, aufgetragen.

T a b e l l e 19

Impfstoff mit Mittel- wert	III 0,0636	II 0,852	I 1,245
I $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 1,245	1,1814	0,393	_____
II $\text{Al}(\text{OH})_3$ 0,852	0,7884	_____	_____
III ohne Adsorb. 0,0636	_____	_____	_____

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich ist, sind nach 90 Tagen Versuchszeit die Unterschiede der Titermittelwerte der drei Tiergruppen, die mit Impfstoff I, II und III behandelt wurden, signifikant, da die Differenzen der Titermittelwerte größer als $K'' = 0,377$ sind.

Titerergebnisse nach 60 Tagen:

Die Berechnung von K'' für die Titerergebnisse nach 60 Tagen ergibt einen Wert von 0,314. Die Differenz der Titermittelwerte zwischen den Tiergruppen, die mit Impfstoff I bzw. Impfstoff II behandelt wurden, beträgt 0,18 und ist kleiner als K'' . Der Unterschied der Titermittelwerte zwischen diesen beiden Tiergruppen ist nicht signifikant.

Die Unterschiede der Titermittelwerte zwischen den Tiergruppen, die mit Impfstoff I bzw. Impfstoff III, sowie mit Impfstoff II bzw. Impfstoff III behandelt wurden, sind signifikant, weil die Differenzen der Titermittelwerte, die 0,679 sowie 0,859 betragen, größer als $K''=0,314$ sind.

b) Ermittlung des Fehlers der Mittelwertdifferenz der
Tiergewichtsgruppen

Die Berechnung wird durchgeführt nach der Methode des Vergleichs des mittleren Fehlers der Differenz zweier Mittelwerte (KOLLER 45).

Dieser Methode liegt die Frage zugrunde, ob die Gewichtsreihen der Meerschweinchen als Stichprobe aus derselben Grundgesamtheit aufgefaßt werden können.

Der mittlere Fehler der Differenz der Gewichtsmittelwerte (σ_D) ist als

$$\sigma_D = \pm \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_2} + \frac{\sigma_2^2}{n_1}}$$

zu bestimmen.

σ_1 = mittlere Abweichung der Gewichte in der ersten Reihe
 σ_2 = " " " " " " zweiten Reihe
 n_1 = Anzahl der Tiere in der ersten Reihe
 n_2 = " " " " " zweiten Reihe

σ_{D1} wird zwischen den Gewichtsreihen der Tiergruppen, die mit Impfstoff I bzw. Impfstoff II behandelt wurden, ermittelt.

σ_{D2} wird zwischen den Gewichtsreihen der Tiergruppen, die mit Impfstoff II bzw. Impfstoff III behandelt wurden, berechnet.

Für die Berechnung werden die Gewichte der Meerschweinchen vom 90.Tag nach Versuchsbeginn herangezogen.

1.) Ermittlung von σ_1 :

σ_1 ist die mittlere Abweichung der Gewichte in der Tiergruppe, die mit Impfstoff I behandelt wurde. Die Berechnung wird nach dem Summenverfahren (WEBER 52) durchgeführt.

n_1 = Anzahl der Gewichte = 7

M_1 = Mittelwert der Gewichte = 522,85

M_1^2 = 273372,1225

$n_1 \cdot M_1^2$ = 1913604,8575

T a b e l l e 20

Gewicht g	
x	x ²
540	291600
520	270400
500	250000
540	291600
595	354025
420	176400
545	297025
S ₁ = 3660	Sx ₁ ² = 1931050

$$\sigma_1 = \pm \sqrt{\frac{Sx_1^2 - n_1 \cdot M_1^2}{n_1 - 1}}$$

$$\sigma_1 = \pm \sqrt{\frac{1931050 - 1913604,8575}{6}}$$

$$\sigma_1 = \pm \sqrt{2907,5237}$$

$$\sigma_1 = 53,92$$

2.) Ermittlung von σ_2 :

σ_2 ist die mittlere Abweichung der Gewichte in der Tiergruppe, die mit Impfstoff II behandelt wurde .

T a b e l l e 21

Gewicht g	
x	x ²
495	245025
545	297025
495	245025
535	286225
500	250000
460	211600
620	384400
S ₂ = 3650	Sx ₂ ² = 1919300

$$n_2 = 7$$

$$M_2 = 521,42$$

$$M_2^2 = 271878,8164$$

$$n_2 \cdot M_2^2 = 1903151,7148$$

$$\sigma_2 = \pm \sqrt{\frac{Sx_2^2 - n_2 \cdot M_2^2}{n_2 - 1}} = \pm \sqrt{\frac{1919300 - 1903151,7148}{6}} = \pm \sqrt{2691,3808}$$

$$\sigma_2 = 51,87$$

3.) Ermittlung von σ_3 :

σ_3 ist die mittlere Abweichung der Gewichte in der Tiergruppe, die mit Impfstoff III behandelt wurde .

T a b e l l e 22

Gewicht g		
x	x ²	
420	176400	
350	122500	n ₃ = 7
485	235225	
490	240100	M ₃ = 464,28
495	245025	
480	230400	M ₃ ² = 215555,9184
530	280900	
S ₃ = 3250	Sx ₃ ² = 1530550	n ₃ · M ₃ ² = 1508891,4288

$$\sigma_3 = \pm \sqrt{\frac{Sx_3^2 - n_3 \cdot M_3^2}{n_3 - 1}} = \pm \sqrt{\frac{1530550 - 1508891,4288}{6}} = \pm \sqrt{3609,7618}$$

$$\sigma_3 = 60,08$$

Berechnung des mittleren Fehlers der Differenz der Gewichtsmittelwerte:

$$\sigma_{D1} = \pm \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_2} + \frac{\sigma_2^2}{n_1}} = \pm \sqrt{\frac{2907,5237}{7} + \frac{2691,3808}{7}} = \pm \sqrt{799,8435}$$

$$\sigma_{D1} = 28,28$$

$$\sigma_{D2} = \pm \sqrt{\frac{\sigma_2^2}{n_3} + \frac{\sigma_3^2}{n_2}} = \pm \sqrt{\frac{2691,3808}{7} + \frac{3609,7618}{7}} = \pm \sqrt{900,1632}$$

$$\sigma_{D2} = 30,027$$

Das Vielfache von σ_D stellt sich dar als $t = \frac{M_1 - M_2}{\sigma_D}$ und wird als t-Verteilung bezeichnet, wobei $M_1 - M_2$ die Differenz der Mittelwerte der Gewichte in zwei Gruppen darstellt.

$$t_1 = \frac{M_1 - M_2}{\sigma_{D1}} = \frac{522,85 - 521,42}{28,28} = \frac{1,43}{28,28} = 0,055$$

$$t_2 = \frac{M_2 - M_3}{\sigma_{D2}} = \frac{521,42 - 464,28}{30,027} = \frac{57,14}{30,027} = 1,902$$

Nach der t-Verteilung von "STUDENT" läßt sich ein Wert von $t = 3,8$ bei der Anzahl der Freiheitsgrade $n_f = n_1 + n_2 - 2 = 12$ und einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0,27% ermitteln. Die Differenz der Mittelwerte der Gewichte kann nach der t-Verteilung von "STUDENT" das 3,8-fache von σ_{D1} bzw. σ_{D2} bei einer Sicherungsgrenze von 0,27% sein.

In den untersuchten Fällen sind die Differenzen der Mittelwerte das 0,055-fache bzw. das 1,902-fache des Fehlers der Mittelwertdifferenzen σ_{D1} bzw. σ_{D2} .

Es zeigt sich, daß der t-Wert in beiden Fällen wesentlich kleiner ist als der aus der t-Verteilung abgelesene Wert $t = 3,8$.

Die Gewichtsreihen der Meerschweinchen können als Stichproben aus derselben Grundgesamtheit aufgefaßt werden.

Es liegt kein signifikanter Unterschied in den Gewichtsreihen vor.

D. Zusammenfassung und Diskussion

Das Ziel der Arbeit war der Aufbau eines definierten Diphtherie-Toxoid-Depot-Impfstoffes, um eine Qualitätsverbesserung zu erreichen.

Der Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoff stellt ein Adsorptionssystem dar.

Als Adsorbendum stand Diphtherie-Formol-Toxoid, Behringwerke, zur Verfügung. Der Lf-Wert wurde nach der Methode der β -Flockung nach RAMON mit 60 Lf/ml bestimmt.

Als Adsorbens wurde γ -Aluminiumoxyd ausgewählt, das eine Oberfläche von $62300 \text{ m}^2/\text{Mol}$ und einen Wassergehalt von 1,5g% hatte.

Zur Aufnahme der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme und zur Ermittlung ihrer Konstanten für das Adsorptionssystem Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd mußten verschiedene Voraussetzungen geprüft werden.

Es wurde gefunden, daß zur Erreichung der Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes für das System Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd ein mindestens 10 Min. langes maschinelles Schütteln (220 Schwingungen/Min.) erforderlich ist. Eine Nachadsorption konnte nicht festgestellt werden.

Eine Abhängigkeit der Adsorption vom p_H -Wert konnte für das System Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd gefunden werden. Die höchste Adsorption war bei einem p_H -Wert von 6,0 durch direkte Einstellung mit $n/100$ Salzsäure und $n/100$ Natronlauge festzustellen.

Die Adsorption wurde auch durch die Molarität beeinflusst. Sie wurde kleiner, wenn die Molarität größer als 0,25, bezogen auf den Zusatz von Natriumchlorid, war.

Ein Einfluß der Temperatur auf die Adsorption von Diphtherie-Toxoid an γ -Aluminiumoxyd konnte in den Bereichen von 5, 10, 20 und 30°C nicht gefunden werden.

Dann wurde geprüft, ob für das vorliegende Adsorptionssystem Diphtherie-Toxoid - γ -Aluminiumoxyd die Freundlich'sche Adsorptionsisotherme gilt. Die Gültigkeit der

Freundlich'schen Adsorptionsisotherme konnte gezeigt werden. Die Konstanten ϵ und $\frac{1}{n}$ wurden bei einer Temperatur von 22°C bestimmt. Durch die Konstanten ist es möglich, den zu jedem Wert für die Gleichgewichtskonzentration gehörenden Wert für den Quotienten aus adsorbierter Diphtherie-Toxoid-Substanz und Masse des Adsorbens anzugeben.

Auf diese Untersuchung aufgebaut, ist der Impfstoff I, Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoff, hergestellt worden.

Als weiterer Depot-Impfstoff ist Impfstoff II, ein Diphtherie-Toxoid-Aluminiumhydroxyd-Depot-Impfstoff, der mit den Handelspräparaten in bezug auf Antigen- und Adsorbens-Menge pro ml übereinstimmt, hergestellt worden.

Impfstoff III war ein Diphtherie-Toxoid-Impfstoff ohne Adsorbenszusatz.

Diese drei Impfstoffe wurden im Meerschweinchenversuch auf ihre Antikörperbildung getestet. Für jeden Impfstoff stand eine Gruppe von 30 Meerschweinchen zur Verfügung.

Die Impfstoffdosis war 1 ml, die Injektion wurde subkutan vorgenommen.

Nach bestimmten Zeitabständen wurden die Tiere entblutet und der Antikörpertiter der Seren durch die intrakutane Kaninchenmethode nach CLAUS JENSEN festgestellt.

Die arithmetischen Mittelwerte der Antikörpertiter der einzelnen Gruppen sind in Abb. 9 in Abhängigkeit zur zeitlichen Blutentnahme graphisch aufgetragen worden.

Bei der Blutentnahme nach 6 Tagen waren die Antikörpertiter der einzelnen Seren aller drei Diphtherie-Toxoid-Impfstoffe, bis auf eine Ausnahme, kleiner als 0,005 IE/ml.

Vom 6. Tag an stiegen die Antikörpertiter der Depot-Impfstoffe stark an, während der Titer des Impfstoffes III nur sehr schwach anstieg und dann fast auf gleicher Höhe bis zum 90. Tag blieb. Es zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Depot-Impfstoffe gegenüber dem Diphtherie-Toxoid-Impfstoff ohne Adsorbenszusatz.

Die Kurven der Titermittelwerte der beiden Depot-Impfstoffe zeigten bis zum 60. Tag ähnliche Verläufe.

Die statistische Auswertung durch den DUNCAN-Test konnte am 60. Tag keinen signifikanten Unterschied der Titermittelwerte der Tiergruppen, die mit Impfstoff I bzw. Impfstoff II behandelt wurden, zeigen. Die Titermittelwerte der Tiergruppen, die mit Impfstoff I bzw. Impfstoff III sowie mit Impfstoff II bzw. Impfstoff III behandelt wurden, unterschieden sich signifikant.

Bei der Betrachtung der Titermittelwerte nach 90. Tagen Versuchsdauer zeigt sich, daß der Titermittelwert der Meer-schweinchen, die mit Impfstoff I behandelt wurden, vom 60. zum 90. Tag erheblich angestiegen ist, während der Titermittelwert der Tiere, die mit Impfstoff II behandelt wurden, etwas abgefallen ist gegenüber dem 60. Tag.

Durch die statistische Auswertung nach dem DUNCAN-Test konnten am 90. Tag der Versuchszeit signifikante Unterschiede der Titermittelwerte der drei Tiergruppen, die mit Impfstoff I, II und III behandelt wurden, ermittelt werden.

Eine weitere statistische Untersuchung wurde durchgeführt, um zu ermitteln, ob die Gewichtsreihen der drei Meerschweinchen-gruppen, die mit Impfstoff I, II und III behandelt wurden, als Stichproben aus derselben Grundgesamtheit aufgefaßt werden können. Für die Berechnung wurden die Tiergewichte vom 90. Tag nach Versuchsbeginn herangezogen. Diese statistischen Untersuchungen haben ergeben, daß die Gewichtsreihen der Meer-schweinchen als Stichproben aus derselben Grundgesamtheit aufgefaßt werden können. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Gewichtsreihen vor.

Die signifikanten Unterschiede der Titermittelwerte nach 90. Tagen Versuchsdauer sind echt und nicht auf eventuelle Gewichtsunterschiede in den einzelnen Tiergruppen zurückzuführen.

Da beide Depot-Impfstoffe die gleiche Antigenmenge, nämlich 30 Lf-Einheiten Diphtherie-Toxoid pro ml, enthielten, war die Qualität des Adsorbens γ -Aluminiumoxyd in Impfstoff I für die bessere Antikörperbildung verantwortlich.

Die bessere durchschnittliche Antikörperbildung von Impfstoff I, mit γ -Aluminiumoxyd als Adsorbens, gegenüber Impfstoff II, mit Aluminiumhydroxyd als Adsorbens, trat aber erst nach 90 Tagen Versuchsdauer hervor. Man kann von einer besseren Depot-Wirkung des Impfstoffes I sprechen, weil der stets steigende Antikörpertiterverlauf von Impfstoff I am 90.Tag höher war als das Maximum der Antikörperbildung von Impfstoff II, das schon am 60.Tag erreicht wurde.

Durch die aktive Schutzimpfung sollen die für die Antikörperbildung verantwortlichen Zellen "lernen", Antikörper zu bilden. Der Organismus erwirbt dadurch die Bereitschaft, das bei einer Infektion anfallende Toxin zu neutralisieren, d.h. sofort mit der Antikörperbildung der "trainierten" Zellen zu antworten. Diese Bereitschaft lag durch die drei untersuchten Diphtherie-Impfstoffe vor; sie unterschied sich aber durch ihre Größe bei den einzelnen Impfstoffen. Bei Impfstoff III war die Bereitschaft sehr klein, während sie bei den Depot-Impfstoffen bedeutend größer war.

Der Vergleich der beiden Depot-Impfstoffe im Zeitraum von 90 Tagen zeigte, daß der Organismus, der mit Impfstoff I behandelt wurde, mit einer größeren Antikörperbildung reagierte als der Organismus, der mit Impfstoff II behandelt wurde. Durch Impfstoff I liegt eine größere Bereitschaft vor, das bei einer Infektion anfallende Toxin zu neutralisieren.

Der Impfplan für die aktive Schutzimpfung sieht eine sechsmalige subkutane oder intramuskuläre Injektion vor. Bei den zu verwendenden Impfstoffen handelt es sich um die im Handel befindlichen Diphtherie-Toxoid-Aluminiumhydroxyd-Adsorbat-Impfstoffe, die in bezug auf Antigen- und Adsorbensmenge die gleiche Zusammensetzung wie Impfstoff II haben.

Der ersten Injektion soll die zweite im Abstand von 4 Wochen folgen. Eine zweite Injektion mit Impfstoff I wäre in diesem Zeitraum nicht nötig, da der Antikörpertiter bis zum untersuchten 90.Tag ständig anstieg und wesentlich höher lag als der durch Impfstoff II erzielte Antikörpertiter, der vom

60. bis zum 90.Tag nicht weiter anstieg.

Durch Impfstoff I, dem Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoff, wurde auf den Organismus ein Antigendauerreiz ausgelöst.

Es wäre von Interesse, bei gleicher Versuchsanordnung die gesetzten Depots einige Monate länger auf den tierischen Organismus einwirken zu lassen und dann eine Belastung der Tiere vorzunehmen. Nach dieser Zeit könnte sich zeigen, ob die Tiere, die mit Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoff behandelt wurden, besser der Belastung standhalten als die Tiere, die Diphtherie-Toxoid-Aluminiumhydroxyd-Depot-Impfstoff injiziert bekamen. Ist dies der Fall, so ist der Aufbau des definierten Diphtherie-Toxoid- γ -Aluminiumoxyd-Depot-Impfstoffs für die bessere Wirkung, die sich schon in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zeitraum abzeichnete, verantwortlich.

E. Literaturangaben

- (1) E. VON BEHRING, Dtsch. Med. Wschr. 16, 1145 (1890)
- (2) E. VON BEHRING u. S. KITASATO, Dtsch. Med. Wschr.
- (3) H. KLEINSCHMIDT, Jahrb. Kinderheilk. 86, 263 (1917)
- (4) T. H. SMITH, J. Exper. Med. 11, 241 (1909)
- (5) E. VON BEHRING, Dtsch. Med. Wschr. 1, 873 (1913)
- (6) W. H. PARK, Amer. J. Obstet and Diseas. Women Childr. 68, 1213 (1913)
- (7) W. GEORGI, Med. Klin. 16, 1061 (1920)
- (8) M. NICOLLE, E. CESARI u. E. DEBAINS, Ann. de L'inst. Pasteur 34, 596 (1920)
- (9) G. RAMON, Compt. R. Soc. Biol. 86, 661 (1922)
G. RAMON, Compt. R. Soc. Biol. 86, 711 (1922)
G. RAMON, Compt. R. Soc. Biol. 86, 813 (1922)
G. RAMON, Ann. de L'inst. Pasteur 37, 1001 (1923)
- (10) A. GLENNY u. H. J. SUDMERSEN, J. og Hyg. (London) 20, 176 (1921)
- (11) E. LOEWENSTEIN, Ztschr. f. Hyg. 62, 491 (1909)
- (12) H. SCHMIDT, Diphtherie, Behringwerk-Mitteilungen, Heft 12, S. 30, Bruno Schultz Verlag, Berlin-Grunewald, 1941
H. SCHMIDT, Grundlagen der spezifischen Therapie, S. 454, Bruno Schultz Verlag, Berlin 1940
- (13) H. THEORELL u. G. NORLIN, Ztschr. f. Imm.-forschg. 91, 62 (1937)
A. BOIVIN, Compt. R. Soc. Biol. 126, 218 (1937)
M. D. EATON, J. of Bact. 31, 347 (1936)
M. D. EATON, J. of Bact. 31, 367 (1936)
M. D. EATON, J. of Bact. 34, 139 (1937)
A. M. PAPPENHEIMER, jr., J. of Biol. Chem. 120, 543 (1937) ref. Zbl. f. Hyg. 41, 176 (1938)
A. M. PAPPENHEIMER, Jr., H. P. LUNDGREN u. J. W. WILLIAMS, J. of Exper. Med. 71, 247 (1940)
- (14) A. T. GLENNY, C. G. POPE, H. WADDINGTON u. U. WALLACE, J. of Path. and Bact. 29, 38 (1926)

- (15) G. RAMON, Compt. R. Soc. Biol. 93, 506 (1925)
- (16) S. SCHMIDT u. A. HANSEN, Biochem. Ztg. 228, 263 (1930)
- (17) L. B. HOLT u. G. BOUSFIELD, Brit. Med. J. 1, 695 (1949)
- (18) R. FRIGGE, Arbeiten aus dem Staatsinstitut für experimentelle Therapie und dem Georg Speyer-Haus zu Frankfurt A. M., S. 1, Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1935
- (19) A. SCHMIDT-BURBACH, Zbl. f. Bakt. Orig. 137, 122 (1936)
- (20) C. N. LEACH, C. JENSEN u. G. POECH, Dtsch. Med. Wschr. 1, 793 (1935)
- (21) F. FARAGO, Ztschr. f. Hyg. 120, 521 (1938)
F. FARAGO, Amer. J. of Hyg. 22, 495 (1935)
- (22) cit.: H. WIESNER in H. SPIESS, Schutzimpfungen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958
- (23) J. POTEL, Dtsch. Apoth.-Ztg. 101, 1331 (1961)
- (24) G. HENNEBERG, Münch. Med. Wschr. 102, 2223 (1960)
- (25) J. DRESCHER, Zbl. f. Bakt., I. Orig., 177, 149 (1960)
- (26) J. DRESCHER, Abhandl. a. d. Bundesgesundheitsamt 1, 42 (1957)
- (27) F. FARAGO, Ztschr. f. Immun.-forsch. 86, 191 (1935)
- (28) G. HENNEBERG u. L. WAGNER, Zbl. f. Bakt., I Orig., 159, 482 (1953)
G. HENNEBERG u. E. WENGEL, Arch. ges. Virusforsch. 3, 237 (1953)
- (29) R. FRICKE, F. NIEMANN u. C. FEICHTNER, Ber. Dtsch. chem. Ges. 702, 2318 (1937)
- (30) H. FREUNDLICH, Kapillarchemie, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1909
- (31) Cl. JENSEN, Die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherie-Toxin und -Antitoxin, Levin und Munksgaard, Kopenhagen, 1933
Communications de L'institut serothérap. de L'état Danois, Extraits, Tome XXIII, 1933
- (32) G. HEYMANN u. J. KRÜGER, Ztschr. f. Immun.-forsch. 119, 131 (1960)

- (33) H. Ulich u. W. JOST, Kurzes Lehrbuch der physikalischen Chemie, S. 78, Verlag von Dr. Dietrich Steinkopf, Darmstadt, 1957
- (34) S. L. CHANG, P. C. G. ISAAC u. N. BAIN, Amer. J. of Hyg. 57, 253 (1953)
- (35) G. GAMBOSU, L'Igiene Moderna 48, 1 (1955)
- (36) R. HARE u. M. CURL, Canad. J. Research E. 25, 43 (1947)
- (37) R. WAHL u. S. LEWI, Compt. R. Soc. Biol. 52, 591 (1939)
- (38) H. WUNDERLI, Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 132, 1 (1951)
- (39) J. DRESCHER, Zbl. f. Bakt., I Orig., 168, 217 (1957)
- (40) J. DRESCHER, Zbl. f. Bakt., I Orig., 168, 235 (1957)
- (41) J. DRESCHER, Zbl. f. Bakt., I Orig., 179, 17 (1960)
- (42) J. DRESCHER, Amer. J. of Hyg. 74, 104 (1961)
- (43) K. H. SENSCH, Dissertation Berlin (1962)
- (44) C. SCHREIER, Zbl. f. Bakt., I Orig., 182, 443 (1961)
- (45) S. KOLLER, Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, Verlag von Theodor Steinkopf, Dresden und Leipzig, 1940
- (46) H. SCHMIDT, Diphtherie, Behringwerke-Mitteilungen, 12, S. 38, Bruno Schultz Verlag, Berlin-Grunewald, 1941
- (47) E. MASCHMANN, E. KÜSTER u. W. FISCHER, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 64, 2174 (1931)
- (48) A. LINDER, Statistische Methoden, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, 1957
- (49) H. VOSS in Vorbereitung
- (50) D. B. DUNCAN, Biometrics, 11, 1 (1955)
- (51) F. W. KÜSTER, A. THIEL u. K. FISCHBECK, Logarithmische Rechentafeln, 65. - 67. Auflage, S. 146, Verlag Walter de Gruyter u. Co., Berlin 1955
- (52) E. WEBER, Grundriß der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler und Mediziner, Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1948

Lebenslauf

Am 22. Dezember 1935 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Max Stenschke und seiner Ehefrau Betti, geb. Steiner, in Berlin geboren.

Im Mai 1940 zogen wir nach Birnbaum/Warthe, wo ich von 1942 bis Januar 1945 die Grundschule besuchte. Nach Berlin zurückgekehrt, kam ich 1946 auf die Oberschule in Berlin-Reinickendorf, an der ich 1955 die Reifeprüfung ablegte.

Nach zweijähriger Praktikantenzeit in einer öffentlichen Apotheke legte ich im März 1957 die pharmazeutische Vorprüfung in Berlin ab. Anschließend begann ich das Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Berlin. Nach zwei Semestern wechselte ich zur Freien Universität Berlin und bestand im Mai 1960 die pharmazeutische Prüfung.

Im Mai 1961 wurde mir die Bestallung als Apotheker erteilt.

Das Thema der vorliegenden Promotionsarbeit erhielt ich im Juli 1960 von Herrn Prof. Dr. med. Georg Henneberg, dem Direktor des Robert Koch-Instituts Berlin.

